T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOLEDRONİK ASİDİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Doktora Tezi

Hadi ROUHRAZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevbahar TURGAN

İZMİR
2016

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOLEDRONİK ASİDİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Doktora Tezi

Hadi ROUHRAZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevbahar TURGAN

İZMİR
2016

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

	(Adı Soyadı)	(İmza)
Başkan: (Danışman)	Nevbahar Turgan	
Üye:	Prof. Dr. Gülnihal Ercan	
Üye:	Prof. Dr. Gülsen Güler	
Üye:	Prof. Dr. Canan Güler	
Üye:	Prof Dr Ece	

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 27/12/2016

ÖNSÖZ

Kendisini tanıdığım günden bu yana, gerek akademik gerekse sosyal, birlikte olduğumuz her ortamda üstün bilgisini, deneyimini, öngörüsünü̈ benden esirgemeyen, sorularımı sabırla cevaplayan, benim için her anlamıyla eğitici ve öğretici olan, zihnimdeki “Danışman” ifadesinin, tüm yönleriyle tam da karşılığı, çok sevdiğim, saygıdeğer danışmanım, Sayın Prof. Dr. Nevbahar TURGAN'a,

Tez çalışmam süresince değerli fikirleri, eşsiz bilgi birikimi ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan, tecrübesini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Gülperi ÖKTEMe,

Her üyesi birbirinden kıymetli, deneylerimde yardımcı olan "ÖktemLab" arkadaşlarıma,

Doktora eğitimime başladığım günden itibaren çalışmalarımı yaptığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’ndaki tüm hocalarıma, tez çalışmam süresince yardım ve desteğini sunan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’ndaki tüm hocalarıma,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimi ve tez çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, canım annem Tahereh NİKKHOU ve sevgili babam Atouf ROUHRAZİe, ağabeyim ve kardeşime,

Son olarak, her koşulda yanımda olan, sabrını, sevgisini, ilgisini benden hiç esirgemeyen, sevgili eşim, hayat arkadaşım Katira SOLEYMANZADEH'ye, ve hayatıma anlam veren yavrum Janmehr ROUHRAZİ'ye,

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İzmir, Aralık 2016 Hadi ROUHRAZI

ÖZET

Zoledronik Asidin Kanser Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri

AMAÇ: Kanser kök hücreleri (KKH) kendi kendini yenileyebilme ve farklı tümör alt tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip küçük bir hücre popülasyonu olarak, tümör yığınını oluşturan diğer daha düşük tümör oluşturma potansiyeline sahip hücrelerden (non-KKH) ayrılmaktadırlar. Tümörün tekrarlamasından, uzak metastazdan, anjiyogenezden ve ilaç direncinden kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Apoptoza direnç, KKH'lerinin en önemli özelliklerinden biridir. Bisfosfonatlar, osteoporoz ve iskelet ile ilgili malignitelerin tedavisinde kullanılan bir bileşik sınıfıdır. Üçüncü nesil ve en etkili bifosfonatlardan biri olan Zoledronik asid (ZA) 'in hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiş olup bazı malignitelerde hücre ölümünün indüksiyonu yoluyla anti-tümör etkileri vardır. Ancak, ZA'in KKH'leri üzerindeki etkileri bugüne kadar araştırılmamıştır. Bu projenin amacı, prostat ve meme KKH'leri model sistem olarak kullanılarak ZA'in KKH'leri üzerindeki apoptotik etkisini ve bu etkinin mekanizmalarını belirlemektir.

YÖNTEM: Prostat DU-145 hücrelerinden CD 133^{+high}/$CD44^{+high}$ yüzey belirteçlerine sahip KKH'leri ve meme MCF-7 hücrelerinden CD 44^{+high}/$CD24^{-low}$ yüzey belirteçlerine sahip KKH'leri flow sitometri metoduyla FACSAria flow sitometri kullanılarak izole edildiler. KKH ve non-KKH'leri 24, 48 ve 72 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (0-140 μM) ZA ile muamele edildi ve IC_{50} dozunu belirlemek için canlılık deneyleri yapıldı. Muse ™ Cell Analyzer kullanılarak hücre ölümü tespiti için hücre döngüsü ve Annexin-V analizleri gerçekleştirildi. Hücre gruplarında apoptoz ile ilişkili 84 anahtar genin tespiti için qRT-PCR array kullanıldı. İfadesi anlamlı ölçüde değişmiş genlerin protein seviyesinin doğrulaması immünofloresan mikroskopi ile gerçekleştirildi

BULGULAR: ZA, hücre canlılığında doz ve zamana bağlı düşüşe neden oldu. IC_{50} dozu, prostat DU-145 hücrelerinde KKH'leri ve non-KKH'leri arasında anlamlı farklı bulunurken, meme MCF-7 hücrelerinde KKH'leri ve non-KKH'leri arasında fark bulunmadı. ZA ile muamele, hücre döngüsünün S fazında duraklamasına ve

apoptoz artışına neden oldu. ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde incelediğimiz apoptoz ile ilişkili genlerin yedisinin ifadesinde anlamlı artış/azalış tespit edildi. *CASP9*, *CASP4*, *BAX* ve *BAD* genlerinin ifadeleri artarken, *BIRC3*, *BIRC2* ve *BCL2* genlerinin ifadeleri azaldı. DU-145 non-KKH'lerinde, 5 genin ifadesinde ZA muamelesinden sonra değişiklik görüldü; 2'si aşırı ekspresyon (CASP7 ve BAD), 3'ü düşük ekspresyon (BIRC3, BIRC2 veBCL2) gösterdi.

SONUÇ: Verilerimiz ZA'in bazı pro-apoptotik genlerin aşırı ekspresyonu ve bazı anti-apoptotik genlerin düşük ekspresyonu yoluyla apoptozu indükleyerek prostat KKH'lerindeki apoptoza direncin üstesinden gelme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koydu. Bulgularımız, KKH'lerinde saptadığımız bu apoptotik indüksiyonun altında yatan mekanizmanın mevalonat yolağının ZA tarafından inhibisyonu olabileceğini göstermektedir. Bu veriler, ZA'in KKH'lerinde apoptoz direncini hedef alan etkili bir terapötik yaklaşım oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser Kök Hücresi; Apoptoz; İlaç direnci; Bifosfonat; Zoledronik asid

ABSTRACT

The Apoptotic Effects of Zoledronic Acid on Cancer Stem Cells

Objective: In contrast to low-tumorigenic bulk tumor cells (non-CSCs), cancer stem cells (CSCs) are a subset of tumor cells with the potential to self-renew and differentiate into different cancer subtypes. CSCs are thought to be responsible for tumor recurrence, distant metastasis, angiogenesis, and drug/radiation resistance. Resistance to apoptosis is one of the most important features of CSCs. Bisphosphonates are a class of compounds designed to treat osteoporosis and skeletal related malignancies. Zoledronic acid (ZA), a third generation and one of the most potent bisphosphonates, has been shown to reduce cell proliferation and has anti-tumor effects through cell death induction in some malignancies. However, the effects of ZA on CSCs remain unclear. The present study aimed to determine the apoptotic effect of ZA on CSCs using prostate and breast CSCs as a model system.

Material and Method: Cluster of differentiation (CD) 133^{+high}/$CD44^{+high}$ prostate CSCs were isolated from the DU-145 human prostate cancer cell line and CD 44^{+high}/$CD24^{-low}$ breast CSCs were isolated from the MCF-7 human breast cancer cell line through FACSAria flow cytometry cell sorting. CSCs and non-CSCs were exposed to increasing concentrations of ZA (0-140 μM) for 24, 48 and 72 hours and the viability was examined to determine the IC_{50} dose. Cell cycle and Annexin-V analyses were performed for the detection of cell death using Muse™ Cell Analyzer. Cell groups was assayed by qRT-PCR array for the detection of 84 key apoptosis related genes and immunofluorescence microscopy performed to validate protein expression of related significantly altered gene experience.

Results: Zoledronic acid caused a dose- and time-dependent decrease in cell viability. Interestingly, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was significantly different between CSCs and non-CSCs in DU-145 cells but there was not find significant differences between CSCs and non-CSCs in MCF-7 cells. Treatment with ZA caused a concomitant increase in apoptosis and S phase cell

cycle arrest. Significant over/under-expressions were detected in seven of the studied genes of ZA-treated DU-145 CSCs cells. Expressions of *CASP9*, *CASP4*, *BAX* and *BAD* genes increased while the expressions of *BIRC3*, *BIRC2* and *BCL2* genes decreased. In the DU-145 non-CSCs, 5 genes showed changes in gene expression after ZA treatment, with 2 showing increased expression (*CASP7* and *BAD*) and 3 showing decreased expression (*BIRC3*, *BIRC2* and*BCL2*).

Conclusion: Our data revealed that ZA has the potential to overcome apoptosis resistance in prostate CSCs by induction of apoptosis through up-regulation of some pro-apoptotic and down-regulation of some anti-apoptotic genes. Inhibition of the mevalonate pathway by ZA seems to be the probable underlying mechanism of the apoptotic induction in prostate CSCs. These data suggest that, ZA may be an effective therapeutic approach for targeting apoptosis resistance in CSCs.

Keywords: Cancer stem cell; Apoptosis; Drug resistance; Biphosphonate; Zoledronic acid

İçindekiler

BÖLÜM I 1

1. GİRİŞ 1

BOLÜM II 5

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Kanser Kök Hücreleri 5

2.1.1. Kanser Kök Hücrelerin Tanımı 5

2.1.2. Kanser Kök Hücrelerin Tanımlanması 6

2.1.3. Terapötik Bir Hedef Olarak KKH'ler 7

2.1.3.1. Yüzey Marker Bazlı Terapi 8

2.1.3.2. Sinyal Yolağı Hedefleme Terapi 9

2.1.3.2.1. Wnt/B-Katenin Sinyal Yolağı 10

2.1.3.2.2. Notch sinyal yolağı 10

2.1.3.2.3. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı 10

2.1.3.3. Protein Detoksifikasyon Bazlı Terapiler 10

2.1.3.3.1. Aldehid dehidrojenaz (ALDH) 10

2.1.3.3.2. İlaç-dışarı atım pompası ABCG2 Hedefleme.11

2.2. Bifosfonatlar 11

2.2.1. Tanım ve tarihçe 11

3.2.2. Akım Sitometri Cihazında Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Toplanması 12

2.2.3. ZA'in potansiyel antikanser etkileri 15

2.2.3.1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi.....15

2.3. KKH'lerinde Apoptoz Sinyal Yolağı 16

2.3.1. Apoptozisin Ekstrensek Yolağı 17

2.3.2. Apoptozisin İçsel Yolağı 18

2.3.3. KKH'lerinde Apoptozis Sinyal Yolakları 19

BÖLÜM III 22

3. GEREÇ VE YÖNTEM 22

3.1. Materyaller 22

3.1.1. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar 22

3.1.2. Çözeltilerin hazırlanması 24

3.1.2.1. Zoledronik asid çözeltisinin hazırlanması 24

3.1.2.2. %70'lik Etanol Çözeltisinin Hazırlanması 24

3.1.2.3. Hücre hattı kültürü için medyumun hazırlanması 24

3.2. Yöntem 25

3.2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Çoğaltılması 25

3.2.2. Akım Sitometri Cihazında Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Toplanması 26

3.2.2.1. DU-145 Hücrelerin ayırımı 26

3.2.2.2. MCF-7 Hücrelerin ayırımı 27

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 27

3.2.4. Hücre Canlılığı ve IC_{50} değerlerin Belirlenmesi 28

3.2.5. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü 29

3.2.6. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi 31

3.2.7. İmmunfloresan Yöntemi 32

3.2.8. RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması 33

3.2.9.cDNA sentezi 34

3.2.10. Gen Ekspresyon Analizi 35

3.2.10.1. Gen Ekspresyon Analizi Aşamaları 40

3.2.10.2. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Veri Analizi 41

3.2.10.3. Veri Analizinin Yorumlanması 42

3.3. İstatiksel Analiz 42

BÖLÜM IV 43

4. BULGULAR 43

4.1. KKH'lerin ayırımı, oran ve saflığının belirlenmesi 43

4.2. Canlılık/Viabilite Bulguları 44

4.2.1. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe ZA'in sitotoksik etkilerinin incelenmesi 44

4.2.2. MCF-7 İnsan meme kanseri hücre kültüründe ZA'in sitotoksik etkileri 48

4.3. IC_{50} değerlerinin belirlenmesi 52

4.4. Apoptozis deneyleri bulguları 53

4.4.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri 53

4.4.2. İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri..... 56

4.5. Hücre döngüsü deneyleri bulguları 59

4.5.1. DU-145 hücrelerinde Zoledronik asidin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri 59

4.5.2. MCF-7 hücrelerinde Zoledronik asidin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri 61

4.6. Gen ekspresyon deneyleri 63

4.6.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri 63

4.7. Zoledronik asidin gen ifadesini anlamlı etkilediği apoptotik proteinlerin İmmunofloresans boyama yöntemi ile doğrulaması 70

BÖLÜM V 77
5. TARTIŞMA 77
BÖLÜM VI 83
6. Sonuç ve Öneriler 83
BÖLÜM VII 86
7. KAYNAKLAR 86
Özgeçmiş 111

Tablolar Dizini

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firma bilgileri.....22
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....22
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri 23
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar 23
Tablo 3.5. Hücre kültürü için hazırlanan medyumun bileşenleri 24
Tablo 3.6. İncelenen apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları 38
Tablo 3.7. PCR karışımının bileşenleri 40
Tablo 3.8. SYBR green mastermiksin içeriği 40
Tablo 3.9. PCR için döngü koşulları 40
Tablo 3.10. Kontrol için kullanılan genler 41
Tablo 4.1. IC_{50} dozu ve 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri 64
Tablo 4.2. IC_{50} doz ve süresi boyunca DU-145 non-KKH'lerine Zoledronik asid uygulanarak RT-PCR analizi sonucunda apoptozis ile ilişkili genlerinin elde edilen ekspresyon değişiklikleri kat cinsinden ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre gösterilmiştir 67

Şekiller Dizini

şekil 2.1. KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları 7
Şekil 2.2. Klinik uygulamalarda kullanılmış olan bifosfonatlar 12
Şekil 2.3. Bisfosfonatların hücresel ve biyokimyasal etki mekanizmaları 13
Şekil 2.4. Mevalonat yolağı ve azot içeren bifosfonatların etkileri 14
Şekil 2.5. Apoptozis sinyal yolağı şeması 17
Şekil 2.6. Apoptozisin intrensek ve ekstrensek sinyal yolakları 19
şekil 3.1. Çalışmadaki 4 deney grubu 27
Şekil 3.2. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin canlılık yüzdesi değerlerinin belirlenmesi 29
Şekil 3.3. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin apoptotik değerlerinin belirlenmesi 30
Şekil 3.4. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin hücre döngüsünü değerlerinin belirlenmesi 32
Şekil 3.5. Human Apoptosis genes RT^2 Profiler PCR Array Prosedürü 36
Şekil 3.6. RT^2 Profiler PCR Array plate düzeni 37
Şekil 4.1. $CD133^+/CD44^+$ prostat kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayırılması 43
Şekil 4.2. $CD44^+/CD24^-$ meme kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayırılması 44
Şekil 4.3. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri..... 45
Şekil 4.4. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 45
Şekil 4.5. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 46
Şekil 4.6. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 46

Şekil 4.7. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 47
Şekil 4.8. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 47
Şekil 4.9. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte MCF-7 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerine etkileri 48
Şekil 4.10. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte MCF-7 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....49
Şekil 4.11. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte MCF-7 KKH'lerde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....49
Şekil 4.12. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 50
Şekil 4.13. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 50
Şekil 4.14. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri 51
Şekil 4.15. ZA'in farklı doz ve sürelerde tüm gruplarda elde edilen hücre canlılığı değerleri 52
Şekil 4.16. Tüm gruplarda ZA'in giderek artan doz ve sürelerde elde edilen hücre canlılığı değerleri ve IC_{50} değerlerini gösteren grafikler.....53
Şekil 4.17. Zoledronik asidin IC_{50} dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan ''total apoptosis'' değerleri.....54
Şekil 4.18. Zoledronik asidin IC_{50} dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.....55
Şekil 4.19. Zoledronik asidin IC_{50} dozu ile 72 saat muamele edilen muamele edilen DU-145 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....55
Şekil 4.20. Zoledronik asidin IC_{50} değerindeki dozuyla 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptosis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....56

Şekil 4.21. MCF-7 KKH ve non-KKH'lerinde IC_{50} değerindeki doz-süre ile zoledronik asid muamelesi sonucunda bulunan ''total apoptozis'' değerleri. 57
Şekil 4.22. MCF-7 KKH ve non-KKH'lerinde IC_{50} değerindeki doz-süre ile zoledronik asid muamelesi sonucunda bulunan apoptotik değerler...58
Şekil 4.23. Zoledronik asid'in 72. saatte IC_{50} değerindeki dozuyla muamele edilen MCF-7 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....58
Şekil 4.24. Zoledronik asid'in 72. saatte IC_{50} değerindeki dozuyla muamele edilen MCF-7 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz yüzde değerlerini gösteren bir örnek. 59
Şekil 4.25. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen DU-145 prostat KKH'lerine ait DNA histogramı. 60
Şekil 4.26. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen DU-145 prostat non-KKH'lerine ait DNA histogramı. 60
Şekil 4.27. Zoledronik asid ile 72 saat süre ile inkübe edilen DU-145 KKH'lerinde ve non-KKH'lerinde doza bağlı olarak G0/G1, S ve G2/M fazlarında neden olduğu değişimler. 61
Şekil 4.28. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 meme KKH'lerine ait DNA histogramı. 62
Şekil 4.29. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 meme non-KKH'lerine ait DNA histogramı. 62
Şekil 4.30. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 KKH'lerinde ve non-KKH'lerinde doza bağlı olarak G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimler. 63
Şekil 4.31. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri..66
Şekil 4.32. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile

belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri..69
Şekil 4.33. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler 70
Şekil 4.34. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler.....71
Şekil 4.35. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bax protein'inde ortaya çıkan değişimler 71
Şekil 4.36. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Kaspaz-7 protein'inde ortaya çıkan değişimler.72
Şekil 4.37. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler 72
Şekil 4.38. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler.....73
Şekil 4.39. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-4 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....73
Şekil 4.40. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-9 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....74
Şekil 4.41. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....74
Şekil 4.42. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler....75
Şekil 4.43. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....75
Şekil 4.44. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler....76

KISALTMALAR LİSTESİ

AKT1	Gene: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALDH	Aldehid dehidrogenaz
ANOVA	Varians analizi
APAF1	Gene: apoptotic peptidase activating factor 1
AREL	Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı
ATP	Adenozin trifosfat
AVEN	Gene: apoptosis, caspase activation inhibitor
BAD	Gene: BCL2-antagonist of cell death
BAG1	Gene: BCL2-associated athanogene
BAK1	Gene: BCL2-antagonist/killer 1
BAX	Gene: BCL2-associated X protein
BBC3	Gene: BCL2 binding component 3
BCL2	Gene: B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L1	Gene: BCL2-like 1
BCL2L10	Gene: BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
BCL2L11	Gene: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL2L13	Gene: BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
BCL2L2	Gene: BCL2-like 2
BID	Gene: BH3 interacting domain death agonist
BIK	Gene: BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
BIRC2	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 2
BIRC3	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 3
BIRC5	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 5
BOK	Gene: BCL2-related ovarian killer
BP	Bifosfonat
c-FLİP	Hücresel FLICE inhibitör protein
CAD	Gene: carbamoyl-phosphate synt. 2, aspartate transcarb., and dihydroorotase
CASP1	Gene: caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP10	Gene: caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP12	Gene: caspase 12 (gene/pseudogene)
CASP14	Gene: caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP2	Gene: caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP3	Gene: caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP4	Gene: caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP5	Gene: caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP6	Gene: caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP7	Gene: caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8	Gene: caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8AP2	Gene: CASP8 associated protein 2
CASP9	Gene: caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
CFLAR	Gene: CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CRADD	Gene: CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CSC	Canser stem cell (Kanser kök hücresi)
C_T	threshold döngü
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFFA	Gene: DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
DIABLO	Gene: diablo homolog (Drosophila)
DU-145	Prostat kanseri hücre hattı
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENDOG	Gene: endonuclease G
FACS	Floresan ile aktifleşmiş hücre ayırışı
FADD	Gene: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain

FAM96A	Gene: family with sequence similarity 96, member A
FAM96B	Gene: family with sequence similarity 96, member B
FAS	Gene: Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASLG	Gene: Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FBS	Fötal Bovin Serumu
FC	Kat değişimi
FITCH	Floresin izotiyosianat
FPP	Farnesil pirofosfat
FPPS	Farnesil pirofosfat sentaz
GE	Genomik Eliminasyon
GGPP	Geranilgeranil pirofosfat
GOA	apoptozis yolağında görevli genler
HGDC	İnsan Genomik DNA kontrolü
Hh	Hedgehog
HKG	housekeeping genler
HMGB1	Gene: high-mobility group box 1
HRK	Gene: harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
HSP90B1	Gene: heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
HTRA2	Gene: HtrA serine peptidase 2
IAP	Apoptoz inhibitor proteinler
IC_{50}	hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KKH	Kanser kök hücresi
KML	Kronik miyeloid lösemi
LRDD	Gene: leucine-rich repeats and death domain containing
MCF 10a	Meme epitel hücre hattı
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MCL1	Gene: myeloid cell leukemia sequence 1
MDA-Bone	Meme kanseri hücre hattı
MDA-231	Meme kanseri hücre hattı
MDA-Met	Meme kanseri hücre hattı
miRNA	Mikro RNA
MOMP	Mitokondrinin dış zarının geçirgenliğinin artışı
mRNA	Mesajcı RNA
N-BP	Azot içeren bifosfonat
ncRNA	Kodlamayan RNA
NF-κB	Nükleer faktör-kapa B
NFKB1	Gene: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	Gene: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NGFR	Sinir büyüme faktörü reseptörü
NGFR	Gene: nerve growth factor receptor
non-KKH	non-Kanser kök hücre
PBS	Fosfat bafer salin
PC3	Prostat kanseri hücre hattı
PI	propidium iodide
PMAIP1	Gene: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)
PPC	PCR pozitif kontrol
PS	Fosfatidilserine
PTEN	Gene: phosphatase and tensin homolog
REL	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RELA	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RELB	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RLT	hücre lizis tamponu
RPMI	Hücre kültürü besiyeri
RT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
RTC	Ters transkripsiyon kontrolü

SD	Standart sapma
Shh	Sonik hedgehog
SOCS2	Gene: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)
SOCS3	Gene: suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)
STAT1	Gene: signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1)
STAT5A	Gene: signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A)
STAT5B	Gene: signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B)
TNF	Gene: tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF)
TNFRSF10A	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNFRSF10B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF10C	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
TNFRSF11B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TNFRSF1A	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF1B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNFRSF21	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21)
TNFRSF25	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 (TNFRSF25)
TNFSF10	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10)
TNFSF11	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (TNFSF11)
TNFSF8	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8 (TNFSF8)
TP53	Gene: tumor protein p53 (TP53)
TP53I3	Gene: tumor protein p53 inducible protein 3 (TP53I3)
TRAF1	Gene: TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)
TRAF2	Gene: TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)
TRAF3	Gene: TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)
TRAF4	Gene: TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4)
TRAF5	Gene: TNF receptor-associated factor 5 (TRAF5)
TRAF6	Gene: TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)
TRAF7	Gene: TNF receptor-associated factor 7 (TRAF7)
TRAİL	TNFe bağımlı apoptoz indükleyen ligand
ZA	Zoledronik asid

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Kanser, dünyada olduğu gibi Türkiye'de de kalp hastalıklarından sonra en önemli mortalite nedenidir ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütünün son verilerine göre, tüm dünyada her yıl 12.4 milyon yeni kanser vakası, 25 milyon kanserli hasta ve 7.6 milyon da kansere bağlı ölüm gözlenirken, Türkiye'de de her yıl 100 bin kişinin 229'una yeni kanser teşhisi konulmaktadır. Artışın bu hızla devam etmesi halinde, 2030'lu yıllarda kanserin 2 misli artacağı ve 100 binde 450'lere yaklaşacağı öngörülmektedir. Bu nedenle, hem dünyada hem de ülkemizde kanser araştırmaları önemli yer tutmaktadır. Kanserin moleküler temellerinin anlaşılmasında, kanser teşhisi ve tedavisinde büyük gelişmeler kaydedilmiş olmasına rağmen bazı kanser türlerinin halen kesin tedavisi bulunmamaktadır. Ameliyat, hormon tedavisi, anti-anjiyogenetik tedavi, immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapi halen tüm dünyada uygulanmakta olan başlıca tedavi yaklaşımlarıdır. Ancak bunların sistemik veya lokal toksisite ve ilaç direnci gibi birçok olumsuz etkileri olmaktadır. Halen en yaygın olarak kullanılan antikanser ajanlar arasında paklitaksel, doksorubisin, sisplatin ilk akla gelenlerdir. Bu ajanlar yüksek bir sitotoksisiteye sahip olduğundan tümör kitlesini ortadan kaldırmada etkili olduklarından klinik uygulamada yer bulmaktadırlar, ancak bunlar doğrudan tümör hücrelerini spesifik hedef olarak almadıklarından (non-target ajanlar) ilaç direnci nedeni ile tümörün nüksüne neden olur. Kanserlerin çoğunda, radyoterapi iyi bir noninvaziv tedavi seçeneği ve yüksek sağkalım oranları sunarken, kanser kök hücreleri (KKH) üzerine etkili olmadıkları için tedavinin etkinliği de düşük olabilmektedir . Her ne kadar KKH'leri tümör kitlesinin çok küçük bir oranını oluştursa da tedaviye direncin ortaya çıkmasında başrolü oynarlar. KKH'lerinin tedaviye dirençli olmasının altında yatan neden ya da mekanizmaların başlıcaları bunların dormant/hücre döngüsü kinetiklerinin yavaş olması, yüksek DNA onarım kapasitesine sahip olmaları, çoklu ilaç direnç taşıyıcılara sahip olmaları (örneğın ABC transporterler gibi), anti-apoptotik proteinleri yüksek miktarda eksprese etmeleri ve mikroçevresel özellikleridir. Geleneksel kanser tedavi yaklaşımları bazı hallerde yukarıda sayılan nedenlerle

etkisiz kalabildiğinden tümörün nüks riskini ve tedavinin yan etkilerini minimize edebilmek için KKH'lerini de hedefleyen terapötik yaklaşımlarla kombine edilerek desteklenmelidir. Bu terapötik yaklaşımların tıpta devrimsel gelişmelere yol açacağına inanılmaktadır. KKH'lerini yok etmek kanserin köklerini ve nüks riskini de minimize edeceğinden kanseri tedavi etmeye ve sağkalım oranlarını arttırmaya yönelik umut verici yaklaşımlar olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerini öldürme çalışmalarında, moleküler hedefleme terapisi, sinyal yolaklarını hedefleme, doğal bileşenler ve bunların güçlü KKH'lerini hedeflemesi, mezenşimal kök hücre kullanımı ve farklılaştırma terapisini (differentiation therapy) içeren birçok yöntem geliştirilmiştir. Son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, kanser kök hücrelerinin tedaviye direnç geliştirme mekanizması halen tam olarak açıklanamamış ve bu nedenle bunlara etkili bir tedavi seçeneği de geliştirilememiştir.

Osteoporoz tedavisinde yaygın olarak kullanılan bifosfonatlar kemik metastazlı hastalarda kemik kaybını azaltarak yaşam kalitesini arttırılarr. Bifosfonatlar yapı ve etki mekanizmalarına göre iki ayrı kuşak oluştururlar. Birinci kuşak bifosfonatlar, klodronat ve etidronat gibi pirofosfata benzeyen bifosfonatlar olup metabolik olarak hidroliz edilemeyen sitotoksik adenozintrifosfat (ATP) analogları oluştururlar. Daha yeni ve güçlü olan ikinci kuşak ise alendronat, pamidronat, risedronat, ibandronat ve zoledronik asid (ZA) gibi nitrojen içeren bifosfonatlardır (N-BPs). ZA mevalonat yolağında anahtar bir enzimi, farnesil pirofosfat sentazı (FPP), inhibe eder. Sonuçta, ZA kemik rezorbsiyonu ve osteoklastların yaşamını etkileyen temel hücresel fonksiyonları bozar. Bu bağlamda ZA, farnesil pirofosfat sentaz enzimini inhibe etmekte diğer bisfosfonatlardan daha etkilidir. Bu yolakda, guanozin Ras, Rho ve Rac gibi trifosfata bağlanan proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu için farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfattan oluşan bir kaç ara ürün gereklidir. Bu sinyal moleküller hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı ve hücre iskeletinin organizasyonunda düzenleyici rol oynarlar.

Osteoklastogenez üzerindeki etkilerine ek olarak, ZA'in solid ve hematolojik malignitelerde dikkat çekici antikanser aktiviteye sahip olduğunu

gösteren çok sayıda preklinik kanıt bildirilmiştir. ZA'in proliferasyon hızının düşürülmesi ve apoptozisi indüklemek gibi doğrudan anti-kanser etkilerinin yanı sıra, antikanser immün yanıtı aktifleştirmek gibi dolaylı etkileri de vardır. Bisfosfonatların doğrudan antitümör aktivitesi için sorumlu birincil mekanizmalardan biri, tümör hücresi apoptozunun indüksiyonudur.

Çok sayıda çalışmanın bulguları ZA'in kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini göstermektedir. Ancak yaptığımız literatür incelemelerinde, bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda kanser kök hücreleri (KKH'leri) ve diğer kanser hücrelerinin (non-KKH'leri) ayrı gruplar halinde ele alınarak aynı hücre hattı içinde incelemelerin KKH'leri ve non-KKH'leri için ayrı ayrı yapılmadığını ve ZA'in KKH'leri üzerine olası apoptotik etkilerinin incelenmediğini fark ettik.

Bu projenin amacı, KKH modeli olarak meme ve prostat KKH kullanılarak, zoledronik asidin *invitro* ortamda KKH'leri üzerine olası apoptotik etkilerinin ve apoptoz ile ilişkili genlerdeki ekspresyon değişimlerinin incelenmesidir. Proje kapsamında zoledronik asidin; meme ve prostat karsinoma hücre hatlarında, meme ve prostat karsinoma kök hücreleri ve kök hücre dışı tümör hücrelerinde apoptoza ve sağkalıma etkileri değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerini apoptoza sevk eden mekanizmaların anlaşılması, gelecekte bugünden daha etkili kanser tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde hayati önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, ZA'in kanser kök hücreleri üzerine olan apoptotik etkileri ve apoptoz ile ilişkili genlerdeki ekspresyon değişikliklerinin *invitro* ortamda incelenmesidir. Bu tez çalışması sürecinde aşağıdaki soruların cevaplarının araştırılması hedeflenmiştir;

1. Meme ve prostat KKH'lerinde ZA'in kanser hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyonunun (IC_{50} değeri) belirlenmesi,
2. Meme ve prostat KKH'lerinde ZA'in indüklediği apoptozun kantitatif olarak belirlenmesi,
3. Meme ve prostat KKH'lerinde ZA'in indüklediği hücre döngüsü üzerindeki olası değişiklikleri,

4. KKH'lerinde ZA'in ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin belirlenmesi,
5. KKH'leri ve diğer tümör hücrelerinde oluşan apoptotik gen ekspresyon değişikliklerinin karşılaştırılması ve olası direnç mekanizmalarının tartışılması
6. KKH'lerinde ZA'in ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin protein seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BOLÜM II

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Kök Hücreleri

2.1.1. Kanser Kök Hücrelerin Tanımı

Tümör dokuları, normal dokularda olduğu gibi, anahtar sinyal yolakları ve işlevlerini düzenleyen yüzey markerlarında farklı derecelerde genetik mutasyona sahip heterojen hücre popülasyonlarından oluşurlar. Kanser hücreleri arasındaki bu işlevsel heterojenlik, iki farklı kanser oluşumu modeli ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlar hiyerarşi modeli ve stokastik modeldir (1,2).

Hiyerarşi modelinde kendini yenileme, nüks, uzak metastaz ve ilaç/ışın direnci gibi kanser modaliteleri, öncelikle kanser kök hücreleri (KKH) ile ilişkilidir. Bu hücreler tümörün içinde çok az sayıda bulunan bir popülasyonu oluştururlar. Belirli bir kanser içinde heterojenlik, KKH'lerinin asimetrik hücre bölünmesi ile oluşur. Bu şekilde tümör içinde bir KKH havuzu ve tümör oluşturma potansiyeli düşük olan non-KKH'leri sınıfı oluşur. KKH'lerinin kanserin kendini yenileme ve metastaz yapabilme özelliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Tümör kitlesini oluşturan diğer tüm hücreler ise, farklılaşmış kardeş hücrelerden türetilmiştir (3).

Tümör içinde bulunan heterojenlik için diğer bir alternatif açıklama stokastik modelden gelmektedir (4). Bu modele göre tümör hücrelerinin hepsi kendini yenileme özelliğine sahiptir ve tümörün devamlılığına değişen ölçülerde katkıda bulunurlar. Buna göre, tümör içerisinde bulunan heterojenlik öncelikle tümörleşme esnasında genetik ve epigenetik heterojenlikten meydana gelen alt klonlardaki değişikliklerden kaynaklanır. Özet olarak, hiyerarşi modeli, altkolonlar arasında genetik değişiklikleri göz önüne almadan hücre büyümesi ve tümör oluşumu açısından fenotipik ve fonksiyonel heterojenliğe odaklıdır. Ancak stokastik model, tümör kitlesinin içinde alt klonlar arasındaki fonksiyonel varyasyonları göz ardı ederek tümörün içinde bulunan genetik heterojenliği vurgulamaktadır (5).

En etkili kanser tedavisi, kendini yenileme, metastaz ve ilaç/radyasyon direnci yeteneği olan kanser hücresi alt popülasyonunu hedefleyen tedavidir.

2.1.2. Kanser Kök Hücrelerin Tanımlanması

Tümör kitlesinde bulunan kanser hücrelerinin çoğunluğu sınırlı bölünme ve tümör oluşturma yeteneğine sahip iken, kanser hücrelerinin sadece belli bir alt popülasyonu kendini yenileme ve yeni bir tümör oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu benzersiz hücre popülasyonuna kanser kök hücreleri (KKH) veya kanser oluşturan hücreler (KOH) ismi verilmiştir. Tümör oluşturan ve geliştiren KKH modeli, tümör alt popülasyonları ile ilişkili fenotipik ve işlevsel değişiklikler için bir açıklama getirmektedir (1).

1963 yılında, Bruce ve arkadaşları, transplante kemirgen lenfoma hücrelerinin sadece %1 – 4'ünün vitro ortamda koloni oluşturabildiğini ya da fare dalağında kanseri başlatabileceğini gösterdiler (6). KKH'lerinin tanımlandığı ilk solid tümör meme kanseridir. Burada KKH'leri $CD44^{+}/CD24^{-}$ ve epitel hücre yüzeyi antijenlerine karşı pozitif olmak üzere sınıflandırılmışlardır.(7,8). Bu hücreler farelere nakledildiklerinde yalnızca 100 kadar hücrenin çoğalabildiği ve yeni tümör oluşturabildikleri gözlenmiştir. Son on yılda beyin (9), akciğer (10,11), karaciğer (12), kolon (13), baş boyun (14), ve diğer (15) solid tümörlerde de KKH'leri tanımlanabilmiştir.

KKH'leri in vitro ortamda aşağıdaki özelliklere göre tanımlanırlar:

a) yüzey markerleri düzey ve paternlerine göre (16–19);

b) süspansiyon kültürlerinde sferik koloni oluşturma yeteneğine göre (20);

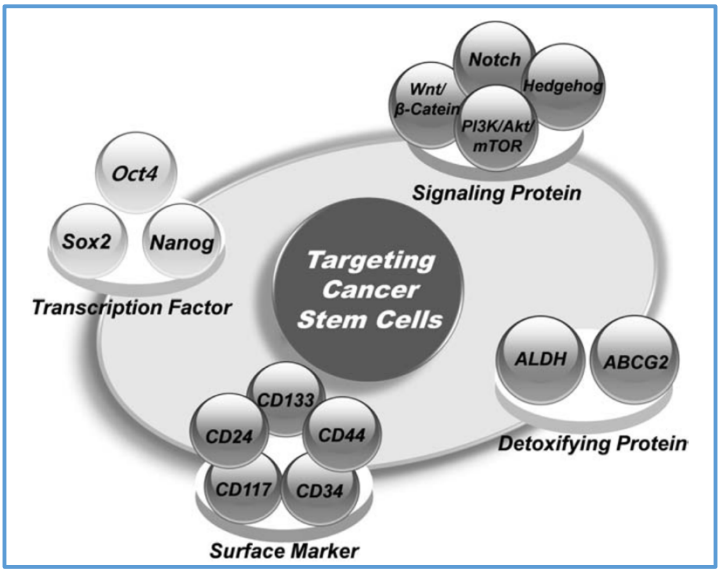
c) konvansiyonel kemoterapötikler veya iyonizan radyasyonlar ile muamele edildiğinde yüksek oranda sağkalım gösterebilme özelliğine göre (21–23).

Malign tümörler içinde az miktarda bulunan bu hücre alt gruplarının tedavi sonrasında tümor başlatma ve büyütme hızı daha yüksektir (18,24–27). Bu durum, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavi seçeneklerinin tümör hücrelerinin önemli bir kısmına etkili olmakla birlikte, yeni tümör oluşturabilen ve dirençli KKH'lerine karşı etkili olamamaları nedeni ile kanser hastalarını tamamen iyileştirmede başarısız olduğunu düşündürmektedir.

2.1.3. Terapötik Bir Hedef Olarak KKH'ler

Hem eski hem de güncel kanser tedavi yaklaşımlarındaki kısıtlılıklar nedeni ile sıklıkla tedavide başarısızlık ve yüksek risk oranları ile karşılaşılmaktadır. Tedavideki başarısızlığın yaygın bir nedeni radyoterapi veya standart kemoterapiye dirençtir. KKH'den zengin popülasyonlar standart tedavilere daha dirençlidir (28). KKH aracılı kemoterapiye direnç lösemi (29), meme (23), melanoma (30), pankreas (31), beyin (32), ve kolorektal (33) kanserlerde belgelenmiştir. Ayrıca, KKH aracılı radyoterapiye direnç beyin (9) ve meme kanserinde (34) gösterilmiştir. Bu nedenle, KKH'lerini yok etmek için özellikle hastaların sağlıklı hücrelerine zarar vermeden yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır (35–37).

Yüzey marker farklılıklarını ve çoklu sinyal yolaklarındaki değişimleri hedefleyerek etkin bir tedavi elde edilebilir. Araştırmacılar son zamanlarda, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi markerleri ve köklük özelliğine ilişkin sinyal yolakları da dahil olmak üzere çok sayıda potansiyel KKH terapötik hedefleri, belirlemişlerdir. Bunların amacı, KKH'lerini ve tümörün nüksünü tamamen ortadan kaldırmak için yeni terapötik hedefleri belirlemektir. Maligniteleri tamamen ortadan kaldırmaya yönelik KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları şekil 2.1'de özetlenmiştir (2).



şekil 2.1. KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları (2)

2.1.3.1. Yüzey Marker Bazlı Terapi

Tümör kütlesinden ve normal sağlıklı hücrelerden KKH'lerini spesifik olarak ayırabilmek için spesifik hücre yüzey belirteçlerini hedeflemek gerekir ki bu KKHlerini hedef alan tedavinin de temelini oluşturmaktadır (38). Halen, floresans-activated cell sorting (FACS), flow sitometri, PCR, ve immünfloresan analiz, KKH'lerinin izolasyonu, saflaştırılması ve tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. KKH belirlenmesi ve yüzey belirteçlerin tanımlanmasında önemli ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, pek çok sorun hala devam etmektedir. Bu nedenle, bu belirteçlerin özgün olmaması ve muhtemelen bazı non-KKH'lerde ve normal hücrelerde de ifade olabilmesi mümkündür. Bu nedenle, KKH markerlerinin, sinyal yolakları ve/veya transkripsiyon faktörleri gibi diğer hedefler ile kombine kullanılması gerekebilir (38).

CD133; Prominin-1 olarak da bilinen CD133 membranı kateden beş bölgeli ve iki büyük N-glikozile hücre dışı ilmeğe sahip 120 KDa'luk bir glikozile proteindir. Yetişkinlerde, CD133 öncelikle immatür hematopoetik kök hücreler ve endotelial progenitör hücrelerin yüzeyinde mevcut olup işlevi ve fizyolojik düzenlenmesi hakkında bilgi azdır (39). CD133'ün kolon ve hepatosellülar karsinoma gibi pek çok insan kanserinde eksprese olur (40,41). Son araştırmalar, CD133 pozitif hücrelerin yüksek sağkalım ve paklitaksel, doksorobisin, sisplatin ve etopozid gibi çeşitli ilaçlara karşı direnç özelliği bulunduğunu göstermektedir (42).

CD44; hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinde rolü olan, çok farklı yapı ve işlevlere sahip bir molekül olup hyaluronik asit için temel reseptördür (43). CD44 ekspresyonu malign hastalıkları olan hastalarda tümör yükü ve metastaza işaret eden faydalı bir göstergedir. CD44; meme (8), over (44), serviks (45), mesane (46), mide (47), kolon (48), pankreas (49), prostat (50), ve akciğer (51) gibi solid kanserlerin KKH'lerinde tespit edilmiştir. CD44'ün birçok kanserde ve KKH'sinde artmış ekspresyonu, CD44'ün hemen hemen tüm kanser tiplerinin gelişmesinde önemli düzenleyici bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Genel olarak, CD44 bir KKH yüzey belirteci olarak çeşitli kanser tiplerinin karakterizasyonunda, tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır.

CD24; CD24 ilk olarak hematolojik malignitelerde tespit edilmiş olan ve çeşitli solid tümörlerde eksprese olan küçük bir hücre yüzey glikoproteinidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan ağır derecede glikozile bir proteindir (52,53). Adezyon ile ilişkili olup kanser hücrelerinin metastaz potansiyeline katkıda bulunur (52). Bu durumda CD24 çeşitli kanser türlerinde önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilebilir. Hücre adezyonu ve metastazı düzenleyici rolleri ile birlikte, CD24 bir prognostik faktör olarak ve yeni KKH belirteci olarak önemli biyolojik rollere sahip gibi görünmektedir (52).

Ayrıca, tümör dokularında KKH'lerini tanımlamak ya da ayırmak için kullanılmış olan hücre yüzeyi belirteçleri sadece KKH'lerinde ifade edilmez, normal kök hücreler ve hatta bazı somatik hücreler de aynı belirteçleri ifade edebilmektedir. Bu nedenle, sadece hücre yüzey belirteç ifadesine bakarak KKH tanımlanması ve izole edilmesi yeterli değildir. Spesifik hücre yüzey belirteçlerinin tespitine ek olarak KKH'lerine özgü gen ifadesi analizleri, ALDH enzim aktivitesinin belirlenmesi, serumsuz ortamda veya yumuşak agarda sferoid oluşumu deneyleri gibi diğer fonksiyon bazlı hedefleme yaklaşımları da kullanılmalıdır.

2.1.3.2. Sinyal Yolağı Hedefleme Terapi

KKH'lerinin belirlenmesi ve ortamdan alınması için diğer bir yol ise KKH'lerinin işlevi için esas olan ve onlara özgü sinyal yolaklarının hedeflenmesidir. KKH'lerinin kendini yenilemesi ve farklılaşması tümör hücrelerinin mikroçevresi ve sitokinler gibi çeşitli düzenleyici sinyal yolakları tarafından düzenlenmektedir. Wnt/β-catenin, Notch ve Hedgehog gibi çeşitli sinyal yolakları kanserin gelişmesi ve ilerlemesini kontrol etmektedir (54). Bu sinyal yolakları hücre proliferasyonu, polaritesi ve büyümesi gibi çok önemli süreçlerin düzenlenmesinde ve kontrolünde büyük önem taşımaktadır.

2.1.3.2.1. Wnt/B-Katenin Sinyal Yolağı

Wnt proteinleri, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan, normal gelişim ve hastalıklardaki çeşitli olayları düzenleyen salgısal sinyal moleküleridir. Wnt/B-Katenin sinyal yolağının, KKH'lerinin fonksiyonlarında düzenleyici rolü olduğu düşünülmekte, akut miyeloid lösemi, kolon ve karaciğer kanseri, melanoma, meme ve akciğer kanserlerinde KKH'lerinin fonksiyonunda rol oynamaktadır (55,56).

2.1.3.2.2. Notch sinyal yolağı

Ntoch yolağı, hücrenin kaderinin belirlenmesi, morfogenez gibi geniş bir yelpazede gelişimi yöneten evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır (57). Bu yolağın pro-onkojen işlevi iyi bilinirken KKH'lerindeki rolü henüz yeni yeni belirlenmektedir.

2.1.3.2.3. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı, ilk olarak Drosophilanın erken gelişimindeki aşamalarda büyüme ile ilişkili olaylarda kritik bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Bu yolak, embriyonik hücrelerde proliferasyon, migrasyon (yapışma/kopma) ve farklılaşmayı düzenler (58–61). Memelilerde bulunan Sonik (Shh), Desert (Dhh) ve Indian Hedgehog (İhh) olarak bilinen üç salgısal liganddan birinin reseptöre bağlanmasıile sinyal başlar. Kronik myeloid lösemi (KML), pankreatik adenokarsinoma, meme kanseri, gliyoblastoma ve multipl miyeloma gibi pek çok insan kanser tipleri üzerindeki araştırmalardan ortaya çıkan verilere göre, Hh sinyal yolağı KKH'lerinin kendi kendini yenileme ve tümorijenisitesini düzenlemektedir.

2.1.3.3. Protein Detoksifikasyon Bazlı Terapiler

2.1.3.3.1. Aldehid dehidrojenaz (ALDH)

$NAD(P)^+$-bağımlı, evrensel olarak korunmuş bir enzim ailesinden olan ALDH, 'aldehid çöpçüsü' olarak hücrenin sitoplazma, çekirdek ve mitokondrisinde yer alan aldehidleri karboksilik asite okside etmektedir (62,63). ALDH aktivitesi ilk

defa lösemi KKH'lerinin izolasyonunda kullanılmıştır (64). Ayrıca, meme kanserlerinin tümörijenik ve kendini yenileme potansiyeli taşıyan alt popülasyonlarında, ALDH-pozitifliğinin kötü klinik sonuç belirleyicilesi olduğu gösterilmiştir (65). Son yıllarda, ALDH aktivitesi melanoma dışında (66), beyin (67), karaciğer (68), baş ve boyun (69), kolon (70), akciğer (10), ve prostat (71) gibi pek çok kanser tipinde evrensel bir KKH markeri olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

2.1.3.3.2. İlaç-dışarı atım pompası ABCG2 Hedeflemesi

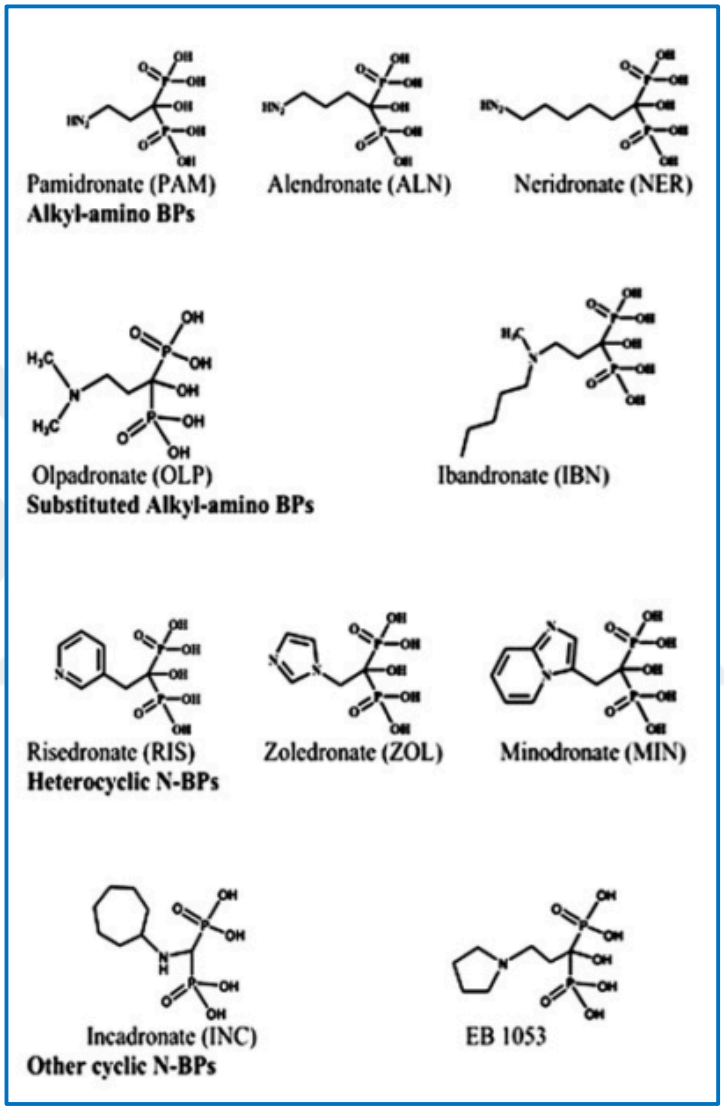
ABCG2; kanser hücrelerine çoklu ilaç direnci kazandıran ATP bağlayıcı çoklu ilaç transporter kaset (ABC) ailesinin bir üyesidir (72). ABCG2'nin geniş substrat afinitesi ve taşıma kapasitesi olduğundan, kanser nüksü ve tümörün çoklu ilaç direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (73). Son yıllarda, prostat (74), beyin (75), limbik epitel (76), pankreas (77), ve akciğer (78) dokularına özgü kök hücre çeşitlerinde ABCG2'nin ekspresyonu gösterilmiştir. ABCG2 ekspresyonunun small interfering RNA (siRNA) ile inhibisyonu ise meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını anlamlı derecede azaltmıştır (79).

2.2. Bifosfonatlar

2.2.1. Tanım ve tarihçe

Halen klinik tıpta ilaç olarak kullanılmakta olan tüm bifosfonatlarda (BP'lar) iki adet P/C bağı bulunur. Bunlar, doğada geniş bir şekilde bulunan pirofosfat bileşiklerinin kimyasal olarak stabil analoglarıdır. Doğada bulunan en basit pirofosfat inorganik pirofosfatdır. Bu bileşiğin endojen bir 'su yumuşatıcısı' olarak vücut içerisinde dolaşmakta olduğunun keşfi ile bisfosfonatlar üzerinde çalışmalar başlatılmıştır. Bifosfonatlar kimyasal olarak 1800'lerde sentezlenmesine rağmen (80), kalsiyum metabolizması bozukluklarının tedavisinde kullanılmaya başlanması son 40 yıl içerisinde olmuştur. İnsanlarda kullanılmış ilk bisfosfonat olan etidronat, ilk olarak 100 yıl önce sentezlenmiştir (81). Ilk yayınlar 1968 yılında abstrakt şeklinde ortaya çıkmış ve ardından 1969 yılında Science dergisinde iki makale yayınlanmıştır. Bu yayınlarda iki bifosfonat olan etidronat ve klodronatın

damarların kalsifikasyonu ve kemik rezerbsiyonu üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur (80,82,83).

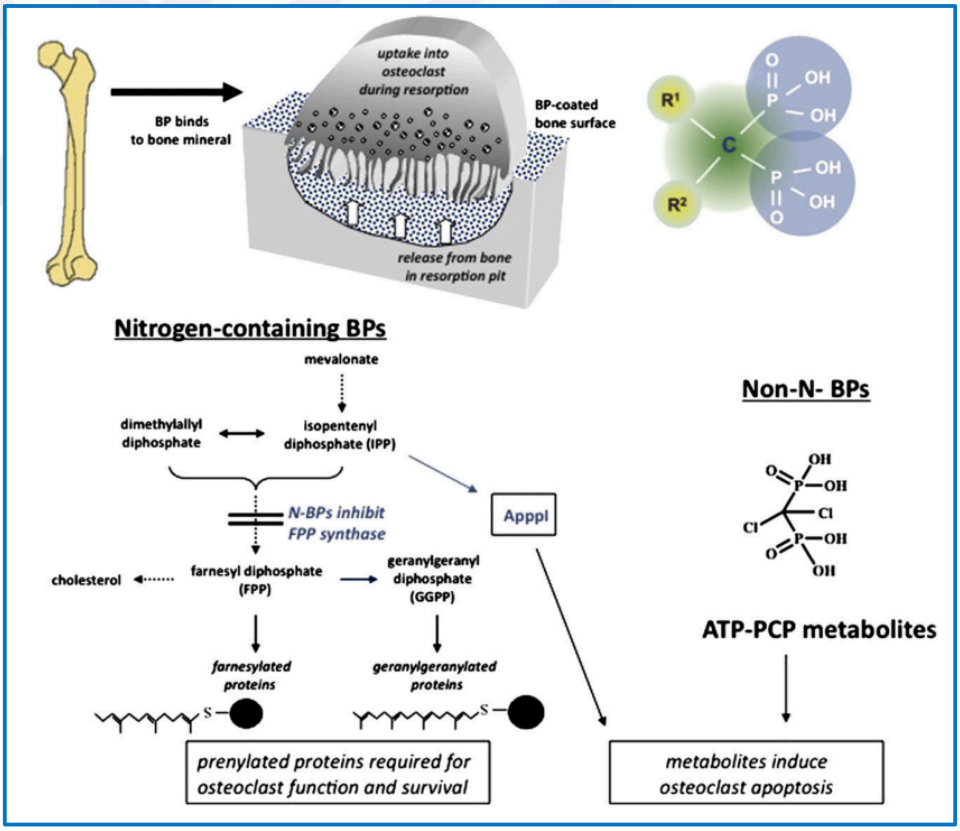


Şekil 2.2. Klinik uygulamalarda kullanılmış olan bifosfonatlar (80)

2.2.2. Biyokimyasal düzeyde bisfosfonatların etki mekanizması

Güncel görüş, bifosfonatların osteoklastlar üzerine etkilerini iki farklı moleküler mekanizma ile oluşturdukları ve bu farklı etki mekanizmaları temel alınarak bifosfonatların en az iki ana gruba ayrılabileceği şeklindedir (84). İlk grup, pirofosfata benzeyen, klodronat ve etidronat gibi nitrojensiz bisfosfonatlardan oluşmaktadır. Klodronat ve etidronat hidroliz olamayan ATP analoglarına

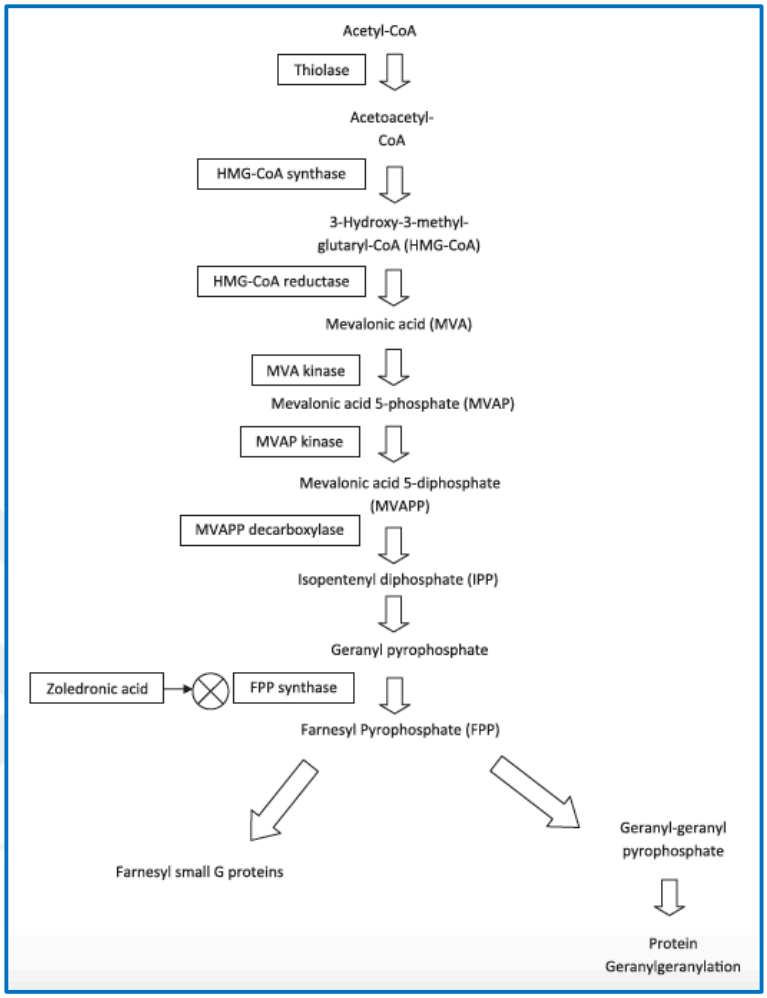
bağlanarak aminoaçil-tRNA sentetazların etkilerini değiştirir ve PPi analogları gibi davranırlar. Ortaya çıkan metabolitlerde, ATP'nin β,γ-fosfat gruplarının yerini P\C\P yapıları alır, bu durumda hidroliz edilemeyen nükleotidler ortaya çıkmaktadır (85–87). Bu metabolitlerin osteoklastların içinde birikmesi ile osteoklast işlevleri inhibe olurken, muhtemelen mitokondri ATP translokazlarla interferans osteoklastik hücre ölümüne yol açmaktadır (80,88,89). Bu nedenle, bu azotsuz bifosfonatlar bir ön ilaç gibi davranmakta, *in vivo* etkilerini osteoklastlar ile hücre içine alındıktan sonra aktif ilaç metabolitlerine dönüşerek göstermektedirler.



Şekil 2.3. Bisfosfonatların hücresel ve biyokimyasal etki mekanizmaları (80).

Bunun tersine, bifosfonatların ikinci grubu yukarıda bahsedildiği gibi AppCp-tip metabolitlere metabolize olmayıp ve azot içeren bileşenlerden (N-BPs) oluşmaktadır. Bu N-BP grubun üyeleri spesifik metabolik tepkimelere özellikle

kolesterol ve diğer sterollerin sentezlendiği mevalonat biyosentez yolağında müdahale etmektedir. Bu yolaktaki enzimler pirofosfat içeren izoprenoid lipidleri, metabolize etmektedir. Bisfosfonatlar bu yolaktaki enzimleri çeşitli derecelerde inhibe edebilirler fakat anti-resorptif N-BP'lar için en büyük hedef farnesil pirofosfat sentazdır (FPPS) (90). Mevalonat yolağında üretilen izoprenoid lipidler arasında izopentenildifosfat (İPP), farnesildifosfat (FPP) ve geranilgeranildifosfat (GGPP) yer alır. FPP ve GGPP, Ras, Rab, Rho ve Rac gibi küçük GTPaz'ların C-terminalinde bulunan sistein kalıntısının pernilasyonu için gereklidir (91,92). Küçük GTPaz'lar osteoklastların hücre morfolojisi, hücre iskeletinin düzenlenmesi, membran dallanması, vezikül trafiği ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rolü olan sinyal proteinlerdir (93–95). Bu proteinlerin işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için prenilasyon gereklidir, çünkü prenil grubu, proteini hücre membranına tutturmak ve protein-protein etkileşimi için gereklidir (şekil 2.4).



Şekil 2.4. Mevalonat yolağı ve azot içeren bifosfonatların etkileri (96)

2.2.3. ZA'in potansiyel antikanser etkileri

Preklinik bulgular, bisfosfonatların tümör hücrelerini inhibe etme yeteneğini açıklayabilecek olası mekanizmalar sunmaktadır (96).

Preklinik verilere göre, ZA'in (ve diğer bisfosfonatların) olası anti-kanser etki mekanizmaları (şekil. 2.4) (96):

1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi
2. Sitotoksik ajanların inhibitör etkilerinin arttırılması
3. Anjiogenezin inhibisyonu
4. Tümör hücresinin kemiğe adezyonunun azatılması
5. Tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyonunun azatılması ve hücre iskeletinin organizasyonunun bozulması

6. γδ T hücrelerinin aktivasyonu
7. tümör makrofaj infiltirasyonu üzerine etkiler

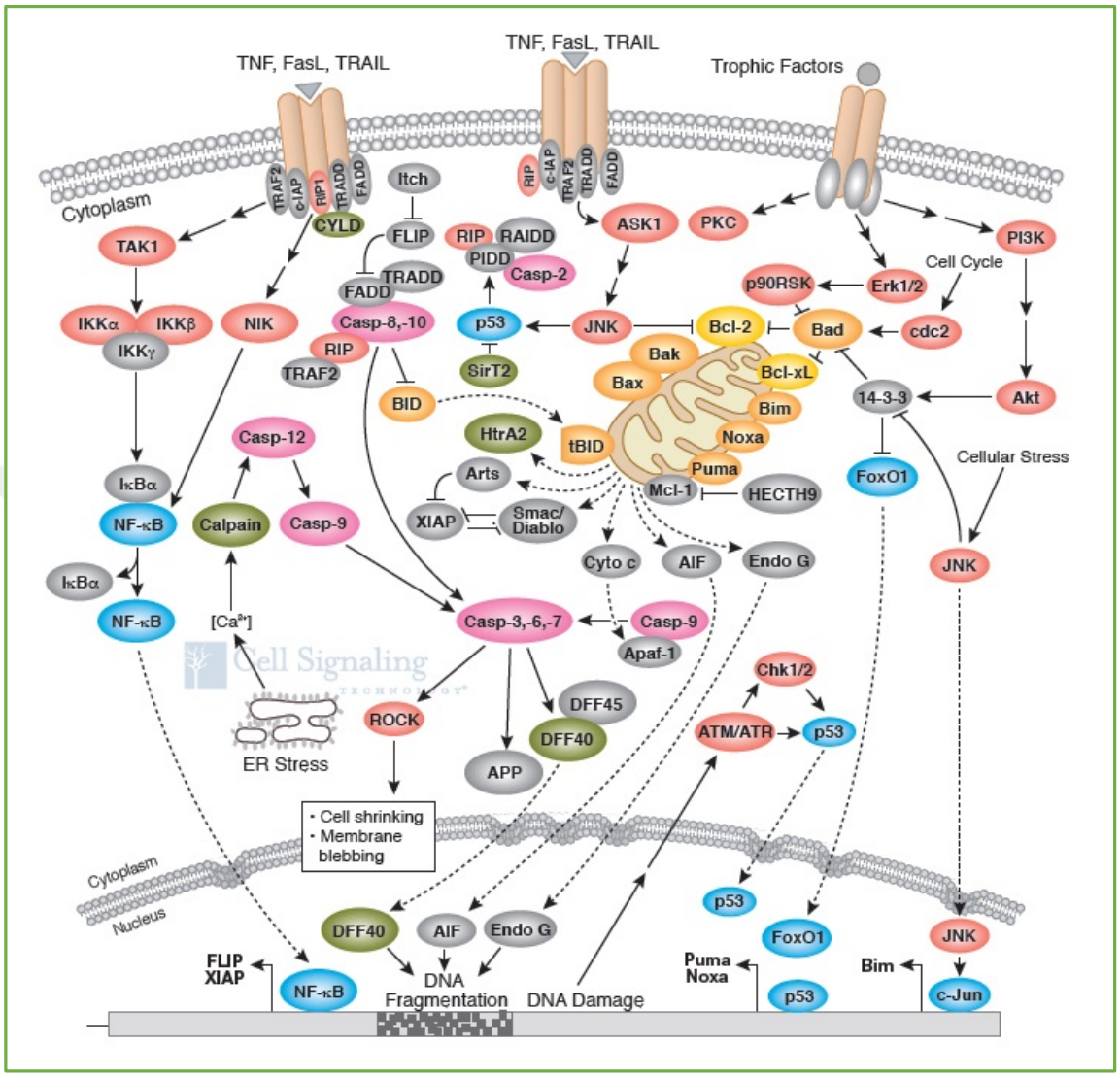
2.2.3.1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi

ZA'in doğrudan antitümör etkisini destekleyen önemli preklinik kanıtlar vardır. ZA'in in vitro ortamda insan fibrosarkoma hücrelerinin proliferasyonunu guçlu bir şekilde inhibe ettiği, hücre döngüsünü S ve G2/M fazları arasında durdurup ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (97). Aynı araştırmacılar, bir fare modelinde ZA'in osteosarkoma hücrelerinin büyümesinin engellediğini bildirmişlerdir (98). Başka bir çalışmada, Zwolak ve arkadaşları, ZA'in kemik sementinden salınabildiğini göstermişlerdir. Proliferasyon deneylerinde, ZA'in stromal dev hücreli tümör kültürlerinde, multipl myeloma ve renal hücreli karsinomada doza bağımlı sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (99). Diğer bir çalışmada, ZA'in dört farklı oral karsinoma hücre hattı üzerinde 10 – 100 mM konsantrasyonlar arasında direkt anti-tümör etkisi gösterilmiştir. ZA apoptotik yolakta kaspaz-3, -8 ve -9'u aktifleştirip apoptozda olan hücre sayısını artırmıştır. Western blotlama analizlerinde ZA'in anti-hman poliADP-riboz polimeraz ifadesini arttırdığı, Bcl2 ve Bid ifadesini azalttığı gösterilmiştir (100). Renal kanser hücre hatlarında (ACHN, A-498 ve CAKI-2), 6.25 – 100 mM konsantrasyonlarında ZA uygulanmasından sonra her üç hücre hattında canlı hücrelerde ZA uygulanmamış kontrollere göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda apoptoz kaspazına bağımlı M30 antijeninde de artış gösterilmiştir. Bu etki Z-VAD pan-kaspaz inhibitörü ile bloke edilebilmektedir (101). ZA'in benzer apoptotic etkisi (5-40 konsantrasyonunda) deksametazon dirençli multiple miyeloma (MM) hücrelerinde de görülmüştür (102). ZA'in anti-tümör etkisinin preklinik kanıtları, akciğer, meme ve prostat gibi diğer solid tümör modelleri için de belgelenmiştir (103,104). En azından preklinik araştırmalarda, ZA'in anti-proliferatif etkisinin en önemli mekanizması apoptozun indüklenmesidir. Bu mekanizmanın klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

Her ne kadar, 15 dakikalık 4 mg ZA intravenöz infüzyonu ile 0.97 mM maksimum konsantrasyon elde edilebilse de (ürün bilgisi: RECLAST(R) IV injeksiyon, Novartis Pharma Stein AG, Stein, Switzerland, 2008), bazı kemik metastazlı meme kanseri fare modellerinde alternatif bir ZA dozaj rejiminin (bölünmüş dozlarda günlük ve haftalık uygulama) tümörü küçültebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, ZA'in bölünmüş dozlar halinde günlük ya da haftalık uygulamaları klinik çalışmalarda daha uygun olabilir.

2.3. KKH'lerinde Apoptoz Sinyal Yolağı

Apoptoz aktif, sıkı düzenlenmekte olan ve enerji bağımlı bir hücre ölümü sürecidir (105,106). Memeli hücrelerinde, apoptoz iki farklı yol üzerinden düzenlenmektedir: ekstrensek ve intrensek yollar. Kaspazlar apoptoz yolağında önemli role sahiplerdir. Kaspaz ailesinin bu iki yolakla aktifleşmesi kromatinin yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması, membranın kabarması ve hücrenin büzüşmesi gibi bir takım hücresel değişimlere neden olur (Şekil 2.5 ve 2.6) (107).



Şekil 2.5. Apoptozis sinyal yolağı şeması (108)

2.3.1. Apoptozisin Ekstrensek Yolağı

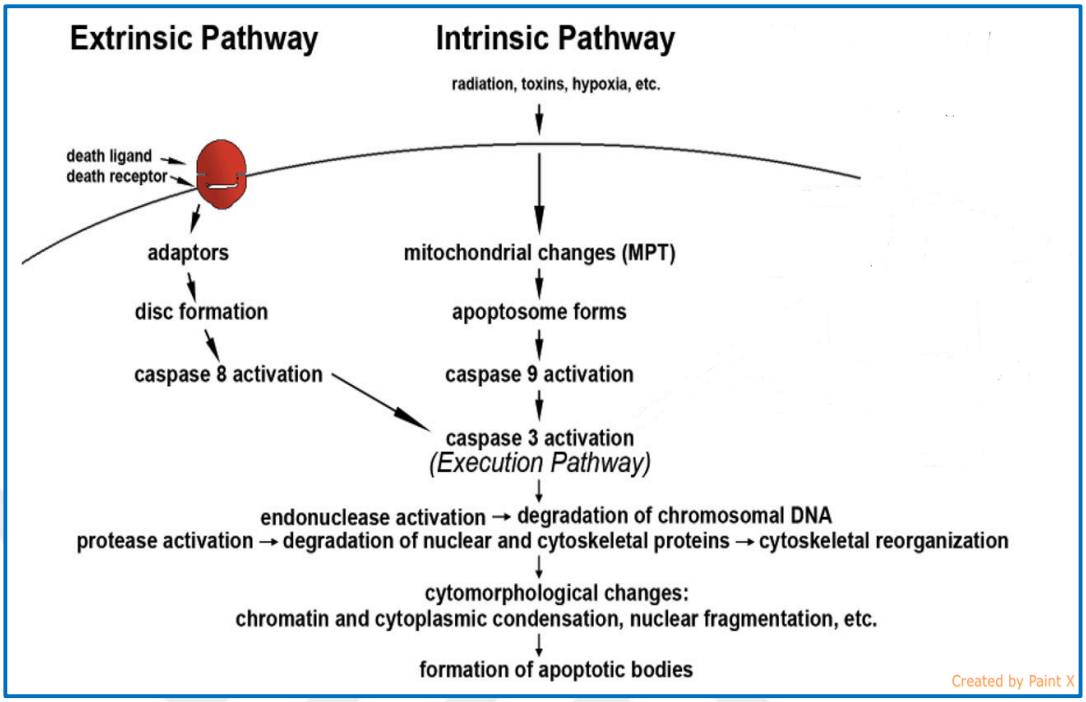
Ekstrensek yolak hücre dışı proapoptotik ligandların ölüm reseptörleri olarak da bilinen CD95, sinir büyüme faktörü reseptörü (NGFR) ve TNF'ye bağımlı apoptoz indükleyen ligand (TRAİL) gibi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ile başlar (şekil 2.5 ve 2.6) (109). Reseptöre bağlandıktan sonra, Fas ile ilgili ölüm domeini (FADD) ve prokaspaz-8 ve -10 dan oluşan ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşturulur (110–112). Oluşan bu kompleks kendi içinde yer alan kaspaz-8 ve -10'u aktifleştirir ve bunun sonucu kaspaz-3 parçalanarak aktifleşip apoptoz sürecini başlatır (113). Ekstrensek yolakda, hücresel FLICE

inhibitör proteinin uzun izoformunun (c-FLIP) downregülasyonu, 195. lizinde übikitinasyon ile ortaya çıkmaktadır (114).

2.3.2. Apoptozisin İçsel Yolağı

Mitokondriyal yolak olarak da bilinen içsel yolak, iyonizan radyasyon, sitotoksik ajanlar ve büyüme faktörünün yokluğu gibi bir takım hücre ve DNA hasarına neden olan stres sinyalleri ile indüklenmektedir. Bunlar mitokondrinin dış zarının geçirgenliğinin artışına (MOMP) ve BH3-only proapoptotik B hücreli lösemi/lenfoma (Bcl-2) ailesi proteinin transkripsyonu veya transkripsyon sonrası aktivasyonuna neden olmaktadır (109). Mitokondri permeabilitesi apoptoz kaskatının anahtar aşamasıdır ve Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Mitokondrinin permeabilitesi sitokrom c ve mitokondriadan oluşan ikinci kaspaz aktivitörü (Smac) gibi apoptotik proteinlerin membranlararası alandan sitozole salınmasına izin vermektedir (115,116).

Sitokrom C ve apoptotik proteaz aktivatör factor-1 (Apaf-1)'in birleşmesi, kaspaz-9'u aktifleştirir, bunun sonucunda kaspaz-3 , -6 ve -7 aktifleşir ve bu şekilde apoptoz gerçekleştirilir (109). Apoptoz proteini inhibitörleri (IAP) kaspaz aktivitesini inhibe ederek hem içsel hem de dışsal apoptozu önlemektedir. Bu mekanizma, apoptoza karşı son koruyucu önlemdir (117). İçsel yolakda ölüm sinyali c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ile de aktifleşebilmektedir, bunun için Bcl-xL'nin serin 62'de fosforillenir ve antiapoptotik etkisi azalır (114). Apoptozun içsel ve dışsal yolaklarının her ikisi de kanser hücrelerinde bozulmuş durumda olup apoptozdan kaçış kanser hücrelerinin temel özelliklerinden biri sayılmaktadır (16,118).



Şekil 2.6. Apoptozisin intrensek ve ekstrensek sinyal yolakları (119)

2.3.3. KKH'lerinde Apoptozis Sinyal Yolakları

KKH'lerinde apoptozun içsel ve dışsal yolaklarının düzenlenmesi bozulur. Glioblastoma ve akciğer KKH'lerinde dışsal yolağa aracılık eden ölüm reseptörleri (DR) yüksek düzeyde eksprese olmakta (120) ve kolon KKH'lerinde DR4'ün upregülasyonu kemoterapi direncine neden olmaktadır (121). Ölüm reseptörüne bağımlı apoptozun negatif modülatörü olan FLICE-benzeri inhibitor proteinleri (cFLIP), iki alt tipten oluşmaktadır: uzun cFLIP (cFLIPL) ve kısa cFLIP (cFLIPS) (122,123). CD133+ glioblastoma, meme kanseri, ve T hücreli akut lösemi hücrelerinde, cFLIP'ler upregüle durumdadır (124,125).

cFLIP'lerin siRNA ile susturulması, hücrenin ölüm uyaranlarına karşı hassasiyetini geri getirerek KKH'lerinin kendini yenilemesini ve tümör metastazını baskılar (126,127). Ölüm reseptörlerinin yetersiz, c-FLIP'lerin yüksek düzeyde ifadesi TRAIL'e karşı KKH'den zengin nörosfer direncine neden olur (128). Apoptoz inhibitor proteinler (IAP) ailesinden bir anti-apoptoz protein olan survivin, hücre bölünmesi, apoptoz ve pluripotensi düzenler (117,129,130). Survivin hematopoetik kök hücrelerde, nöronal pekürsör hücrelerde, CD34(+)/38(−) AML

kök hücrelerinde, glioblastoma ve astrositoma KKH'lerinde yüksek miktarlarda bulunur (131–133). KKH'lerinde upregüle olan diğer IAP proteinler arasında XIAP, c-IAP1, ve Livin sayılabilir (124,133).

KKH'lerinde içsel yolağın düzenlenmesinde bozukluklar başlıca Bcl-2 ailesi proteinlerde ve DNA hasar yanıtında yansıtılmaktadır. Bcl-2 ailesi proteinler anti-apoptoz proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1) ve pro-apoptotik moleküllerden (Bax, Bak, Bid, Bim, Bik, Noxa and Puma) oluşmaktadır (134). Spesifik bir molekülün ifade düzeyinden çok, anti-apoptotik/ pro-apoptotik oranının dengesizliği hücre sağkalımı ve apoptotik uyarılara hassasiyeti belirlemektedir (134). Tümörlerin çoğunda, KKH'lerde anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinler yüksek düzeyde eksprese olmaktadır (135).

Örneğin, CD133+ glioma KKH'lerinde anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri yüksek düzeyde ifade edilmektedir (124,136), glioma KKH'lerinde Mcl-1'in yüksek ifade düzeyi, ABT-737 Bcl-2 inhibitörüne direnç ile orantılıdır (136). Kolon KKH'lerinde, Bcl-2'nin çoğalması apoptoz ve otofajinin inhibisyonuna neden olur (137). Bcl-2 'nin downregülasyonu ve Bax'ın upregülasyonu KKH'lerinde apoptozu indüklemektedir (115,138). Bu nedenle, mitokondriyal ölüm kaskadının inhibisyonu KKH-hedefli kanser tedavi yaklaşımları arasındadır.

DNA hasarına yanıt olarak tümör süpresör p-53-aracılı hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, ve apoptoz DNA hasar yanıtı olarak adlandırılır (139). İnsan glioma ksenograftlarından izole edilmiş glioma KKH'leri ve primer glioblastoma DNA hasarı yanıtını aktifleştirmek yoluyla radyo-rezistans oluşturmaktadır. KKH'lerin radyo-direnci P53'ün upstream aktivatörü Chk1 ve Chk2 çekpoint kinazların spesifik inhibitörü ile geri alınabilmektedir (9). Ek olarak, nükleer faktör-kapa B (NF-κB) sinyali KKH'lerinin apoptozunu pro- ve anti-apoptotik proteinlerin ifadesini etkilemek yolu ile regüle etmektedir. Lösemi kök hücrelerinde, NF-κB aktifleşerek sessiz lösemi hücre sayısını artırmaktadır (140,141). Meme KKH'leri parthenolid, pirolidineditiokarbamat, ve dietilditiokarbamat gibi NF-κB yolağı inhibitörlerine apoptoz ve hassasiyet göstermektedir. CD44+ meme KKH'lerinde CD24 ifadesi bu hücrelerde NF-κB

sinyalini bastırarak DNA hasarının indüklediği apoptozu güçlendirmektedir (142–144).

miRNA'lar küçük ve kodlamayan RNA'lardır (ncRNA'lar). Bunlar, protein translasyonunu target mRNA'lara bağlanarak regüle etmektedir (145). miRNA'lar hücrelerin büyümesi, migrasyonu, invazyonu, ve ilaç hassasiyeti ile ilişkilidir (146,147). Tümör hücrelerinde, miRNA ifadesi düzensiz olup onkojen veya tümör süpresör olarak rol oynar. Örneğin, miR-223, miR-122, ve miR-26 karaciğer tümör süpresörü olup miR-130b, miR-221, ve miR-222 ise, onkojenik faktörlerdir (148–152). Ortaya çıkan kanıtlar miRNA'ların stemness anahtar rolü olduğunu gösterir. Örneğin, let-7, miR-21, miR-22, miR-34, miR-101, miR-146a, ve miR-200 miRNA'ları KKH fenotipini etkiler ve işlevini onkojenik sinyal yolakları hedefleme yoluyla sürdürür (153). Diğer miRNA'lar KKH'lerin kendini yenilemelerini kontrol ederek onların kaderini etkilemektedir. Örneğin, MiR-34 Notch ve bcl-2 gen ifadesini düzenlemek yoluyla insan pankras KKH'leini inhibe etmektedir (154), ve miRNA-34a glioma KKH'lerini çeşitli onkojenleri hedeflemek yoluyla bastırmaktadır (155).

KKH'leri ve non-KKH'leri arasında miRNA ifade seviyesinde fark mevcuttur (156). Örneğin, mir-21 and mir-302 ifadesi KKH'lerinde artmışken let-7a ifadesi azalmıştır. Ek olarak, mir-372, mir-373, ve mir-520c-5p non-KKH'lerde KKH'lere göre yüksek düzeylerde ifade edilmektedir (156).

BÖLÜM III

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler, üretici firma ve katalog bilgileri, kullanılan cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar tablo 2.1, 2.2, 2.3 ve 2.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firma bilgileri.

	Kitin ismi	***Üretim firma ve Katalog numarası***
1	Count&Viability kit	Milipore / Katalog No: MCH100102
2	Annexin V&Dead Cell kit	Milipore / Katalog No:MCH100105
3	Cell Cycle kit	Milipore / Katalog No: MCH100106
4	RNeasy Mini Kit	Qiagen / Katalog No: 74104
5	RT² First Strand Kit	Qiagen / Katalog No: 330401
6	RT^2 PCR Array Yükleme Rezervuarı	Qiagen / Katalog No: 338162
7	RT^2 SYBR Green qPCR Master Mix	Qiagen / Katalog No: 330522
8	Human Apoptosis RT^2 Profiler PCR Array	Qiagen / Katalog No: 330231

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

1	Muse Cell Analyzer, Milipore
2	İnkübatör, Thermo Scientific
3	Soğutmalı santrifüj, Ependorf
4	İnverted Mikroskop, Shimadzu UV-1208
5	Floresan Mikroskop, Olympus BX 50, Japan
6	Laminer kabin, Esco
7	Su Banyosu, Nüve BM 402
8	Vorteks, Dragonlab

9	Etüv, Heraeus, Germany
10	Real Time-PCR Cihazı, Applied Biosystems 7900
11	Gold Blok Termal Cycler, Applied Biosystems PCR System 9700
12	NanoDrop ND-100 DNA, RNA ve protein ölçümü için spektrofotometre
13	Çift Kapılı Buzdolabı, Arçelik
14	Mikrosantrifuj, Eppendorf Minispin plus
15	-80^{o}C derin dondurucu, Thermo
16	Dijital hassas terazi, Sartorius

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

1	PCR tüpleri
2	PBS çözeltisi
3	Pudrasız eldiven
4	Kurutma kağıdı
5	Cam malzemeler (Beher, Erlen ve Mezür)
6	Eppendorf tüp (1,5 mL)
7	Otomatik pipet
8	Steril mikropipetler (10,100,1000 µL)
9	Steril mikropipet uçları (10,100,1000 µL)
10	Seroloji pipetleri (2, 5, 10, 25 mL)
11	PCR tüpleri

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar

1	Zoledronik asid (Sigma Aldrich)
2	RPMI1640 media
3	FBS (Fetal Bovine Serum)
4	Penisilin/Streptomisin
5	Amfoterisin B
6	PBS (Phosphate Buffer Saline)
7	Tripsin-EDTA
8	L-Glutamine
9	Alkol (% 70'lik Etanol Çözeltisi)
10	Steril distile su
11	Steril deyonize su

3.1.2. Çözeltilerin hazırlanması

3.1.2.1. Zoledronik asid çözeltisinin hazırlanması

Zoledronik asid (ZA), Enzo Life Science (Katalog No: ALX-430-153-M025) firmasından satın alındı. Deneylerde kullanmak üzere akışlı kabin altında ve steril ortamda 25 mg ZA tartılarak 2 ml deiyonize su içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti 100 µl'lik hacimler halinde -20°C de saklandı. Deney sırasında, stok çözeltiden gereken miktarlarda alınarak hücre kültürü medyumu için gereken konsantrasyonlarda hazırlandı.

3.1.2.2. %70'lik Etanol Çözeltisinin Hazırlanması

Muse ^{TM} cihazında hücre döngüsü deneyleri için %70'lik soğuk etanol (ice cold) kullanılarak hücreler fikse edildi. %70'lik etanol çözeltisini hazırlamak için kabin altında ve steril ortamda absolü etanolden (Merck, Almanya, 1009832500) 70 ml ve steril distile sudan 30 ml ilavesi ile hazırlandı ve . kullanım zamanına kadar -20^{0}C'de saklandı.

3.1.2.3. Hücre hattı kültürü için medyumun hazırlanması:

Yüzde bir oranında L-Glutamin içeren RPMI1640 çözeltisine %10 oranında Fötal Bovin Serumu , Penisilin/Streptomisin ve Amfoterisin B eklendi. Pipet ile birkaç kez çekilip geri bırakılarak homojen dağılım sağlandı. Hazırlanan medyum, +4^0 C'de saklandı. Kullanılan maddeler ve oranları Tablo 2.5'de yer almıştır.

Tablo 3.5. Hücre kültürü için hazırlanan medyumun bileşenleri

	Solüsyonlar	%	Hacim (ml)
1	RPMI1640 (Lonza, BE12-167F)	1 x	500 ml
2	Fötal Bovin Serumu (Biowest, S1810)	% 10	50 ml
3	L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401)	% 1	5 ml
4	Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010)	% 1	5 ml
5	Amfoterisin B (Lonza, 17-836E)	% 1	5 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Çoğaltılması

İnsan prostat kanseri hücre hattı (DU-145) ve insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu ((American Type Culture Collection=ATCC)'den sağlandı. Hücreler hazırlanmış medyumla 75 cm^2'lik steril Corning polistiren hücre kültürüne özel flasklarda 37^0C'de ve %5 CO_2'li ortamda, inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanma işlemi için, flaskların yüzeyinin %80'den fazla miktarda kaplanmış olması (konfluency= >80%) esas alındı. Flasklardaki hücrelerin üzerindeki besiyeri pipet yardımı ile aspire edilip uzaklaştırıldı. Hücreleri temizleyip yıkamak için flasklardaki hücrelerin üzerine PBS ilave edilip ardından aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücre pasajlama işlemi, flask içerisinde tek tabaka halinde olan hücrelere hiçbir zarar vermeden yüzeyden kaldırıp çözelti içinde süspanse ederek başka bir ortama aktarma prensibine dayalıdır. Hücreler tripsin yardımı ile kaldırıldı. Aktarılan hücreli ortam %5 CO_2'li inkübatörde 37^0 C'de hücreler çoğalıp hücre tabakası oluşturana kadar inkübe edildi. Standardizasyon amacı için hücrelere tripan mavisi uygulanarak hemositometre lamında ışık mikroskop altında incelendi. Her pasajlama işleminde hücre morfolojisi, canlılığı ve sayısı kontrol edildi. Tripsin-EDTA 37°C su banyosunda 15 dakika bekletildi. Hücreler 2.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA ile muamele edilerek en fazla 4 dakika 37^0C, %5 CO_2 ortamında inkübe edilerek flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Sürenin bitiminde hücrelerin flaskın yüzeyinden kopup ayrılması ışık mikroskobu altında gözlendi. Tripsin-EDTA ile muamele edilen hücre ortamına en az 5 ml FBS içeren RPMI 1640 medyumu eklenerek tripsinin aktivesi durduruldu. Flaskta bulunun tüm sıvı pipet ile 15 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edilip 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılıp kalan pellet üzerine 2 ml medyum eklendi. Hafıf hareketle pellet süspanse edildi ve Muse cihazında sayım işlemine geçildi. Sayım işlemi sonrasında hücreler çoğaltılmak için yeni kültür flasklarına alındı. Hücreler 37^0C'de ve % 5 CO_2'li ortamda, inkübatörde kültüre edildi.

3.2.2. Akım Sitometri Cihazında Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Toplanması

DU145 insan prostat kanseri ve MCF7 insan meme kanseri hücreleri %1 L-Glutamin, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 Amfoterisin B içeren RPMI1640 medyumunda 75 cm^2'lik Corning polisitren hücre kültürü flasklarında çoğaltıldı. Ardından hücreler 2.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA ile muamele edilerek 4 dakika 37^0C, %5 CO_2 ortamlı inkübatörde tutulup hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Bekleme süresi dolduktan sonra, her iki tüpün içine FBS içeren 5 ml medyum eklenerek tripsinin inaktivasyonu sağlandı. Her iki tüpten ayrı ayrı tüm sıvı pipet ile çekilerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edilip 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerde kalan pelletin üzerine 5 ml PBS ilave edilip vortekslendi. Her örnekten 20 µl alınıp Muse cihazında sayım yapıldı. Her iki tüpün içinde yaklaşık $3x10^6$ canlı hücrenin varolduğu tespit edildi. Sonrasında bu süspansiyonlar 5 dakika 500 rpm'de santrifüj edilip süpernatantlar üzaklaştırıldı. Ardından tekrar yıkamak amacıyla hücreler ayrı ayrı 1x PBS ile 5 dakika 300 rpm'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.

3.2.2.1. DU-145 Hücrelerin ayırımı

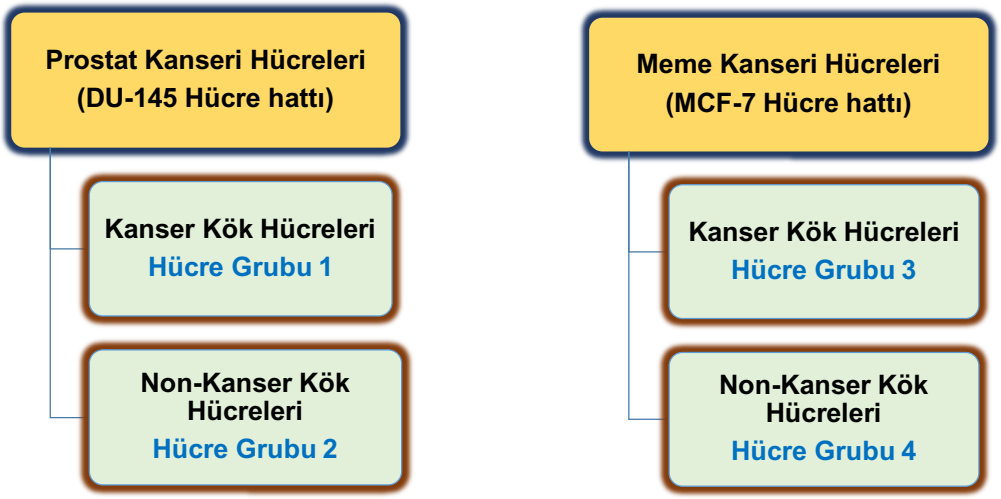
DU145 hücreleri içeren tüpe 10 µl CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10 µl CD133-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklendi. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml PBS eklendi. $CD133^+/CD44^+$ yüzey belirteçleri barındıran DU145 insan prostat kanseri hücrelerinin ayırma işlemi floresan hücre ayırma (FACS) akım sitometri yöntemi ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı (AREL)'de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapıldı. Ayırılan hücreler, $CD133^+/CD44^+$ (sorting) ve bunun dışında kalan hücreler (non-sorting) olarak sınıflanıp, içlerinde 3'er ml RPMI 1640 mediumu bulunan polisitren Falcon tüplerinde toplandı. Ayırma işleminden hemen sonra, bu hücreler çoğaltılmak üzere 25 cm^2'lik polisitren steril Corning hücre kültürü flasklarına alındı.

3.2.2.2. MCF-7 Hücrelerin ayırımı

MCF7 hücreleri içeren tüpe 10 µl CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10 µl CD24-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklendir. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml PBS eklendi. CD133+/CD44+ yüzey belirteçleri barındıran MCF7 insan meme kanseri hücrelerinin ayırma işlemi floresan hücre ayırma (FACS) akım sitometri yöntemi ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı (AREL)'de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapıldı. Ayrılan hücreler, $CD44^{+}/CD24^{-}$ (sorting) ve bunun dışında kalan hücreler (non-sorting) olarak içlerinde 3'er ml RPMI 1640 mediumu bulunan polisitren Falcon tüplerine toplandı. Ayırma işleminden hemen sonra, bu hücreler çoğaltılmak üzere 25 cm2'lik polisitren steril Corning hücre kültürü flasklarına alındı.

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

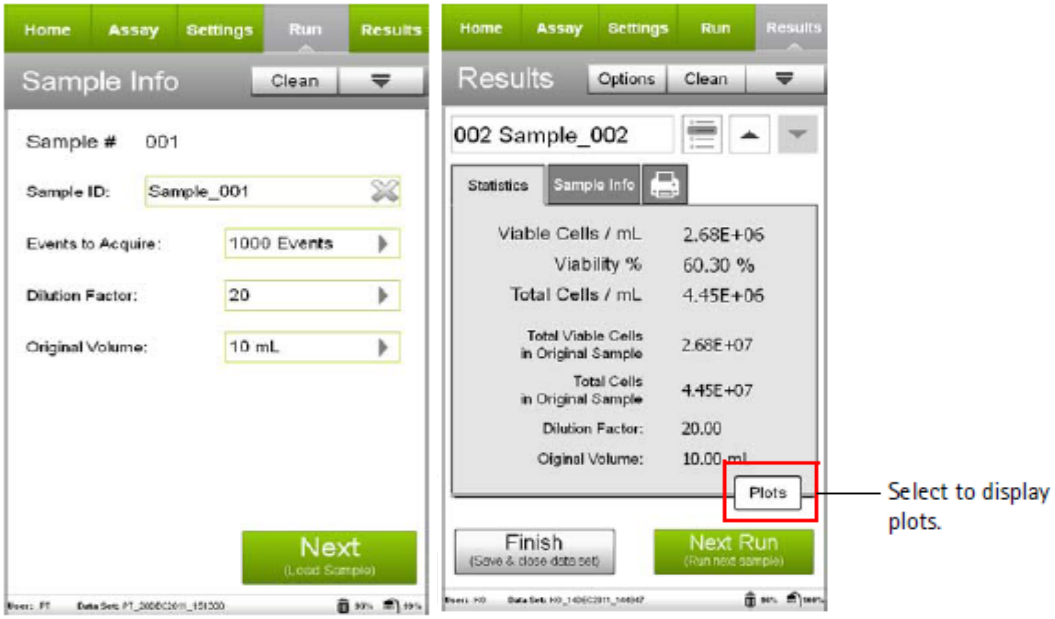
Çalışmamızda, DU-145 insan prostat kanser hücre hattından izole edilen $CD133^{+}/CD44^{+}$ hücreler (DU-145-KKH), DU-145 KKH dışında kalan hücreler (DU-145 non-KKH), MCF-7 insan meme kanser hücre hattından izole edilen $CD133^{+}/CD44^{+}$ hücreleri (MCF-7 KKH), MCF-7 KKH dışında kalan hücreler (MCF-7 non-KKH) olmak üzere 4 farklı hücre grubu ile çalışıldı (Şekil 3.1).



şekil 3.1. Çalışmadaki 4 deney grubu

3.2.4. Hücre Canlılığı ve IC_{50} değerlerin Belirlenmesi

Hücre canlılığı ve sayımı Muse™ Count & Viability Kiti kullanılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile belirlendi. Yöntem, özel bir reaktifin içindeki DNA-bağlayıcı boyaların, hücreler tarafından membran bütünlüğünün kaybedilmesi ile ölü ve canlı hücre çekirdeğinin ayrı ayrı boyanması prensibine dayanmaktadır. Altı kuyucuklu plaklara (6-well plate) $3x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde DU-145 KKH, DU-145 non-KKH, MCF-7 KKH ve MCF-7 non-KKH hücreleri ekildi. Hücrelerin morfolojisini geri kazanıp plak yüzeyine tutunmaları için 24 saat beklendi. Bekleme süresi dolduktan sonra hücrelerin üzerlerine farklı dozlarda (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 µM) Zoledronik asid eklenerek 24, 48 ve 72 saatlik üç farklı inkübasyon süresi uygulandı. Kontrol gruplarında ise sadece medyum kullanıldı. Deneyler 3 tekrar şeklinde uygulandı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri ayrı ayrı pipet ile çekilip her biri etiketlenmiş 5 ml'lik santrifuj tüplerine alındı. Ardından her kuyucuğun içine 0.5'er ml Tripsin-EDTA eklenerek 37^0C'de yaklaşık 3 dakika inkübatörde tutularak hücrelerin plak yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Tripsinin aşırı aktivasyonunu engellemek için her kuyucuğa birer ml serum içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerindeki sıvıların üzerine eklendi, 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp üzerlerine 2'şer ml besiyeri eklenerek yeniden suspanse edildiler. 1.5 ml'lik steril Eppendorf mikrosantrifüj tüplerine ayrı ayrı hücre süspansiyonlarından 20'şer µl ve üzerine Muse™ Count & Viability reaktifinden 380 µl alınarak (1/20 dilüsyon) vorteks ile karıştırılıp 5 dk karanlık ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapıldı. Ölçümler esnasında toplam hücre sayısı, canlı hücrelerin sayısı ve yüzdesi kaydedildi. Bu verilerin ışığında ZA'in hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC_{50} değeri) hesaplandı.

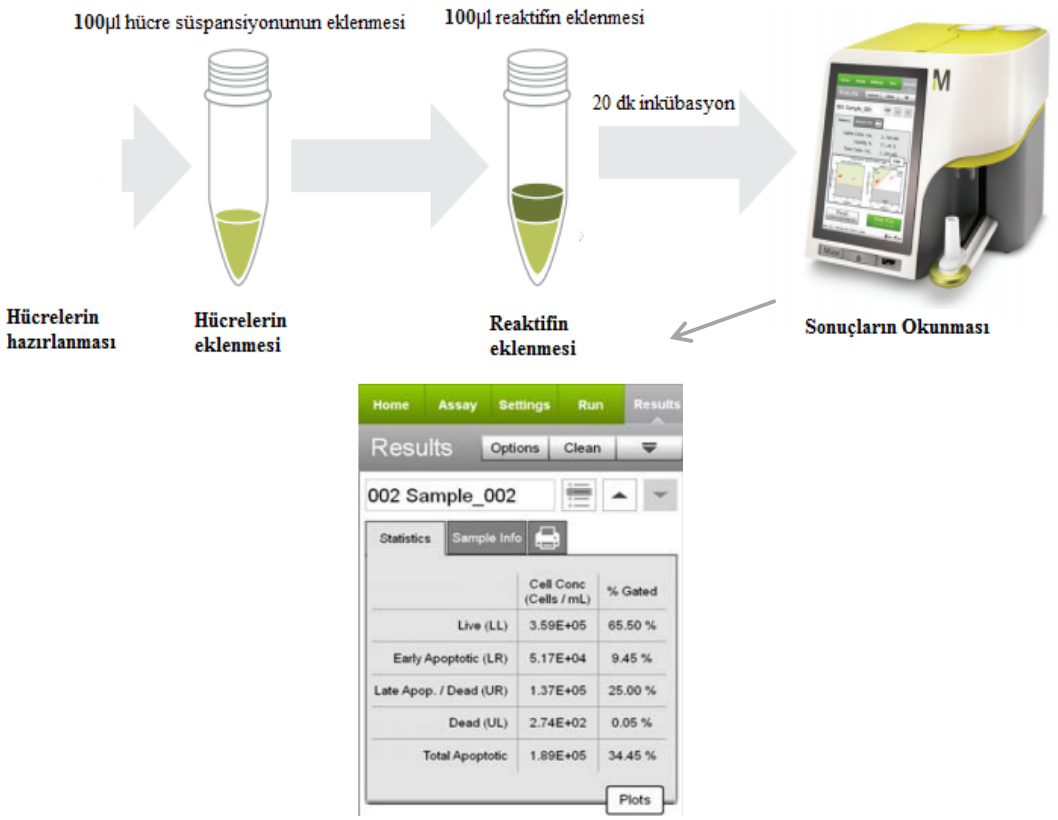


Şekil 3.2. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin canlılık yüzdesi değerlerinin belirlenmesi (157).

3.2.5. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü

Hücrelerin apoptozis incelemesi, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kiti kullanılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile yapıldı. Annexin-V fosfatidilserine (PS) bağlanabilen bir proteindir. PS normalde hücre zarının iç yüzeyinde yerleşmiş olan bir fosfolipittir. Apoptotik hücrede hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Annexin-V dış yüzeye transloke olmuş PS'e bağlanarak apoptotik hücrenin görülebilmesini sağlar. Altı kuyucuklu plaklara her kuyucukta $3x10^4$ hücre olacak şekilde DU-145 KKH, DU-145 non-KKH, MCF-7 KKH ve MCF-7 non-KKH hücreleri ekildi. Hücre morfolojilerinin geri kazanılması ve hücrelerin plak yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübatörde bekletildi. Ardından Zoledronik asidin her hücre grubu için saptadığımız IC_{50} dozları uygulanarak kontrol grubu ile birlikte 37^0C, %5CO_2 ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu hücrelerine için sadece medyum eklendi. Uygulama süreleri dolduktan sonra her kuyucukdaki besiyeri uzaklaştırılıp her kuyucuğa 2'şer ml 1x PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve daha sonra PBS uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 1 ml Tripsin-EDTA eklenip inkübatörde 37^0C'de yaklaşık

3 dakika bekleterek hücrelerin kuyucuk yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Aşırı tripsin aktivitesini önlemek için her kuyucuğa 2 ml serum içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerekher kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş 5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten hemen sonra hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerlerine 2 ml besiyeri eklenerek yeniden süspanse edilmiştir. 1.5 ml'lik steril Eppendorf mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er µl ve Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden 100 µl ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 20 dakika inkübe edildi ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapıldı. Deneyler 3 kez tekrar edildi.



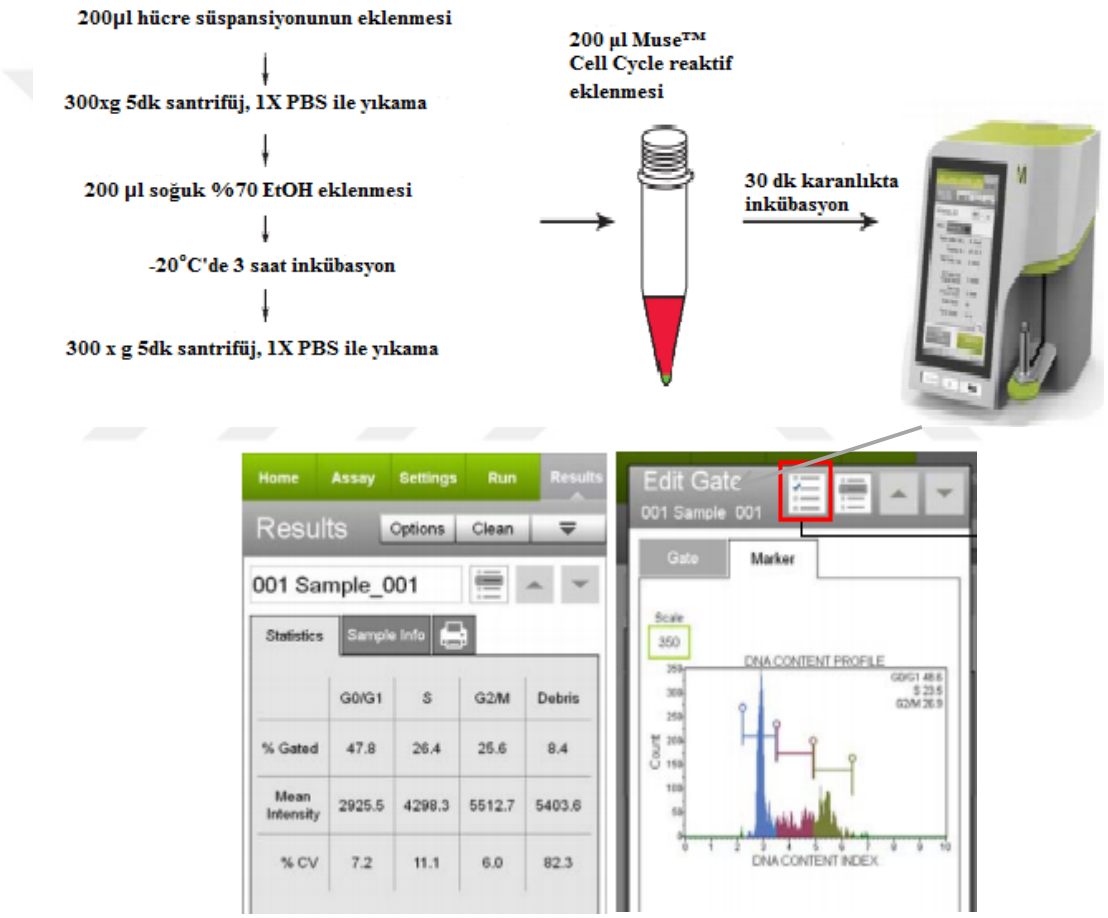
Şekil 3.3. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin apoptotik değerlerinin belirlenmesi (158).

3.2.6. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

Hücre döngü deneyleri, Muse™ Cell Cycle Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile yapıldım. Muse ™ Hücre Döngüsü Kiti, propidium iodide (PI) ve özel bir RNAse A içeren bir reaktif içermektedir. PI, DNA boyanma RNAse'ın varlığında DNA içeriğine bağlı olarak hücre döngüsünün olduğu farklı aşamalarındaki hücreleri ayırt etmektedir. G0/G1 Dinlenme halindeki hücreler her bir kromozomun iki kopyasını içerirmektedir. S fazında bölünmeye başladığında, hücreler DNA sentezlerler. Floresans PI yoğunluğu tüm kromozomal DNA ikiye katlandığında yani G0/G1 fazında artar. G2/M fazında olan hücreler iki hücreye bölünür. Altı kuyucuklu plate'lerde her kuyucuğa $3x10^4$ hücre olacak DU-145 KKH, DU-145 non-KKH, MCF-7 KKH ve MCF-7 non-KKH hücreleri ekildi.

Hücrelerin morfolojisini geri kazanmaları için ve plate yüzeyine tutunmak için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Sonra üzerlerine Zoledronik asid'in her hücre grubu için bulduğumuz IC_{50} dozlarda 72 saatlık inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte 37^0C, %5 CO_2 ortamlı inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu hücreler için sadece medyum eklenmiştir. Muamele süreleri dolduktan sonra her kuyucukdaki besiyeri uzaklaştırılıp ardından her kuyucuğa 2'şer ml 1x PBS eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Bu PBS uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra her kuyucuğa 1'er ml Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 37^0C'de yaklaşık 3 dakika bekleterek hücrelerin kuyucuk yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Tripsini fazla aktivitesini önlemek için her kuyucuğa 2'şer ml serum içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek ayrı ayrı her kuyucuktaki hücreler etiketlenmiş 5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj edildikten hemen sonra hücrelerin üzerindeki süpernatan uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 2'şer ml besiyeri eklenerek resuspansiye edilmiştir. 1.5 ml'lik steril ependorf mikrosantrifüj tüplerine vortekslenmiş hücre süspansiyonlarından 100'er µl alınarak üzerlerine 1 ml 1x PBS ilave edip tekrar vortekslenerek hücreler yıkanmıştır. Ardından 5 dakika 300 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanlar uzaklaştırıldıktan sonra her tüpün üzerine buz soğukluğu ortamda 100'er µl 1x PBS eklenip çok yavaş şekilde vorteksleyerek yine üzerlerine daha önceden

karbuzu içinde khazırlanmış olan % 70'lik etanolden 200µl eklenerek karıştırılıp ve -20'de en az 3 saat inkübe edilmiştir. Bu şekilde hücreler fikse haline gelmiştir. Sonra hücreler 5'er dakika 300 rpm'de santrifüj edilip ve üzerlerine Muse™ Cell Cycle reaktifinden 200'er µl eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında, 30'ar dakika inkübe edilerek Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır. Yapılan deneyler her hücre grubu için 3'er kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.4. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin hücre döngüsünü değerlerinin belirlenmesi (159).

3.2.7. İmmunfloresan Yöntemi

Altılı kuyucuklar içine konulmuş özel lamellerin üzerine alınan hücreler, %1 Glutamin içeren RPMI 1640, 10% FBS ve %5 Amfoterisin-Penisilin-Streptomisin içeren medyumda bir gece boyunca inkübe edildi. Hücrelerin morfolojilerini geri

kazanıp lamel yüzeyine tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra Zoledronik asidin doza ve zamana bağlı olarak belirlenmiş olan IC_{50} değerlerinde kontrol grubu ile birlikte inkübe edildi. Deney kontrol grubuna ise sadece medium eklendi. Hücreler %4 PFA ile 2 saat süre ile fikse edildikten sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Önce %0.1 PBS ve TritonX-100 çözeltisinde 10 dakika ve ardından blocking serumda (Invitrogen, USA) +4°C'de 1 saat bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp Kaspaz-9 (abcam, ab32539), Kaspaz-7 (abcam, ab32522), Kaspaz-4 (abcam, ab25898), BIRC2 (abcam, ab196592), BIRC3 (abcam, ab23423), Bcl-2 (abcam, ab32124), BAX (abcam, ab77566) ve BAD (abcam, ab32445) 1/100 oranında PBS ile dilüe edilip uygulandı. Gece boyunca +4^{o}C'de bekletildi. Uygun sekonder antikor FITC (Abcam, USA) eklenerek 1 saat boyunca +4^{o}C'de bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp DAPI ile kapatılarak Olympus BX 50 marka floresan mikroskopta görüntülendi.

3.2.8. RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

RNA izolasyonu ve saflaştırması için RNeasy Mini Kit'i (Qiagene / Katalog No: 74104) kullanıldı. İzlenen aşamalar kısaca aşağıda açıklanmıştır.

1. Hücreler kaldırılıp sayım yapıldı. 1x10^{6} hücre sonraki aşamalar için işleme alındı.
2. Hücrelerin parçalanması: Oluşan pellet, tüpün üzerine parmak ucu ile hafifçe vurularak dağıtıldı. Hücrelerin üzerine 350 µl hücre lizis (RLT) tamponundan ilave edilip vortekslendi.
3. Lizatın homojenize edilmesi: Oluşan lizat pipet ile direkt 2 ml'lik toplama kolonunun içine alınıp ''shredder spin column'' kolonuna aktarılıp 2 dakika maksimum hız ile santrifüj edildi.
4. Homojenize olmuş lizatın üzerine lizat hacmi kadar %70 etanol ilave edilip pipet yardımı ile karıştırıldı.
5. 2 ml'lik toplama tüpünün içine konulmuş RNeasy spin kolonun içine maksimum 700 µl örnek transfer edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

6. RNeasy spin kolonun üzerine 700 µl RW1 tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkanması için santrifüj edildi. Ardından kolon toplama tüpünden çıkartılıp toplanan sıvı atılıp kolon boşaltıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
7. RNeasy spin kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkaması için santrifüj edildi. Ardından kolon toplama tüpünden çıkartılıp toplanan sıvı atılıp kolon boşaltıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
8. RNeasy spin kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 2 dakika 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkanması için santrifüj edildi. Santrifüj aşamasının uzun olduğu spin kolon membranı kurutularak bu şekilde kalmış olan etanol uzaklaştırıldı.
9. RNeasy spin kolonun altındaki toplama tüpü değiştirilip kalması muhtemel tamponun uzaklaştırılması için 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
10. RNA yıkaması: RNeasy spin kolonu 1.5 ml'lik toplama tüpüne konup doğrudan membranın üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi. Kolonun kapağı kapatılıp 1 dakika 10,000 rpm'de spin RNA'nın yıkanması için santrifüj edildi.
11. Toplama tüpünde toplanan su içindeki RNA sonraki aşamalarda kullanıldı.
12. RNA'nın ölçümü ve kalite kontrolü: İzole edilmiş RNA'nın ölçümü ve kalite kontrolü için NanoDrop ND-100 spektrofotometre kullanıldı. Cihaz RNaz içermeyen su kullanarak köre karşı sıfırlandı. A_{260}/A_{230} oranı 1.7'nin üzerinde ve RNA'nın saflığını gösteren A_{260}/A_{280} oranı 2.0 olarak tespit edildi.
13. Başlangıç için RNA miktarı: her 96'lık plak için total 1 µg RNA kullanıldı.

3.2.9.cDNA sentezi

cDNA sentezi için RT^2 first strand kiti (Qiagen / Katalog No:330401) ve GeneAmp PCR 9700 PCR cihazı kullanıldı.

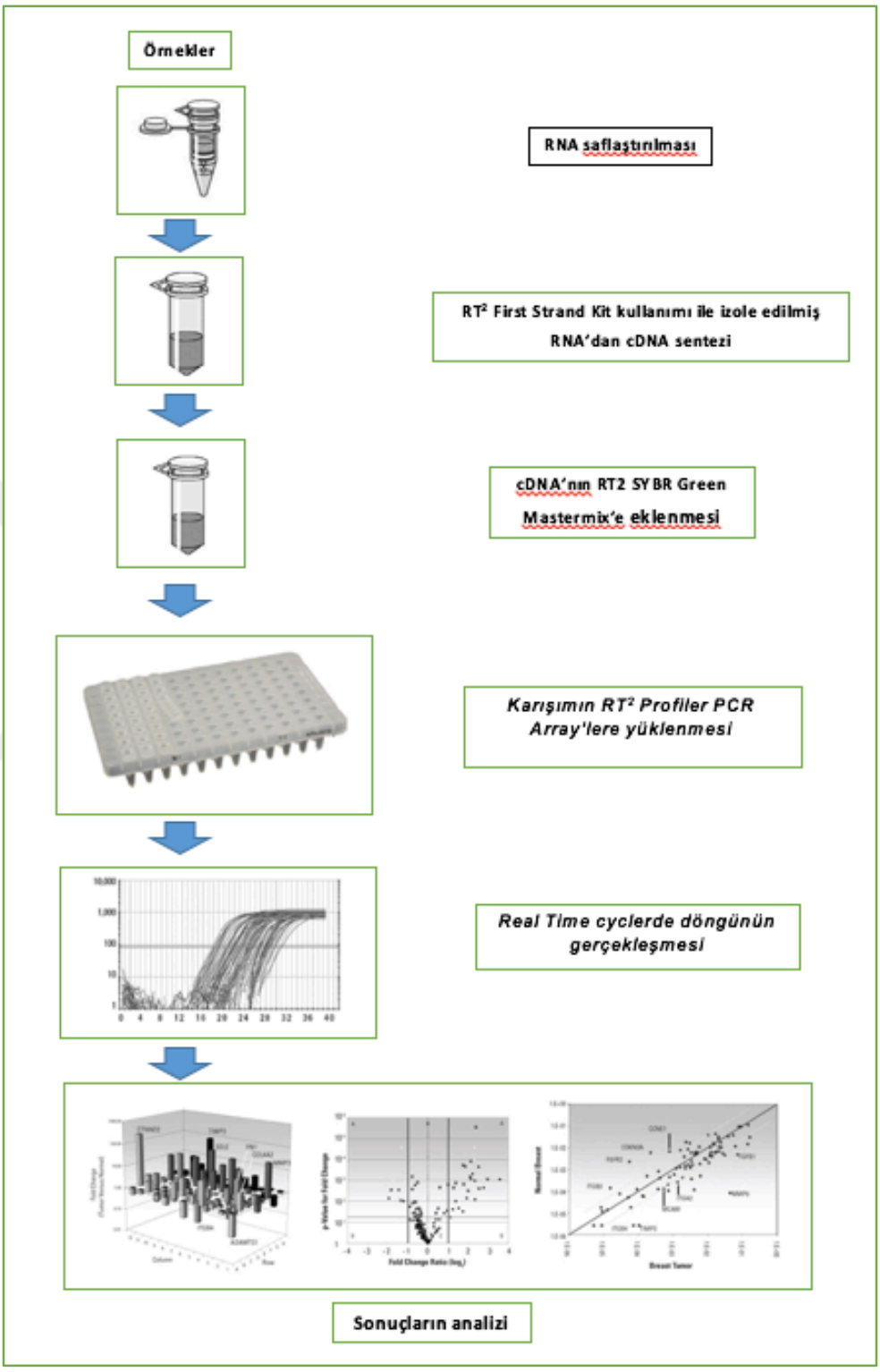
1. DNA elimine eden karışım hazırlanması için, her plak başına, 1 µg RNA, 2 µl Genomik Eliminasyon (GE) tamponu ve 7 µl RNaz içermeyen su

hazırlandı. Karışım yavaşça pipet ile karıştırılıp kısa süre santrifüj edildi. Ardından karışım 5 dakika boyunca 42 °C'de inkübe edilip süre dolduktan sonra en az 1 dakika buzlu ortamda bekletildi.

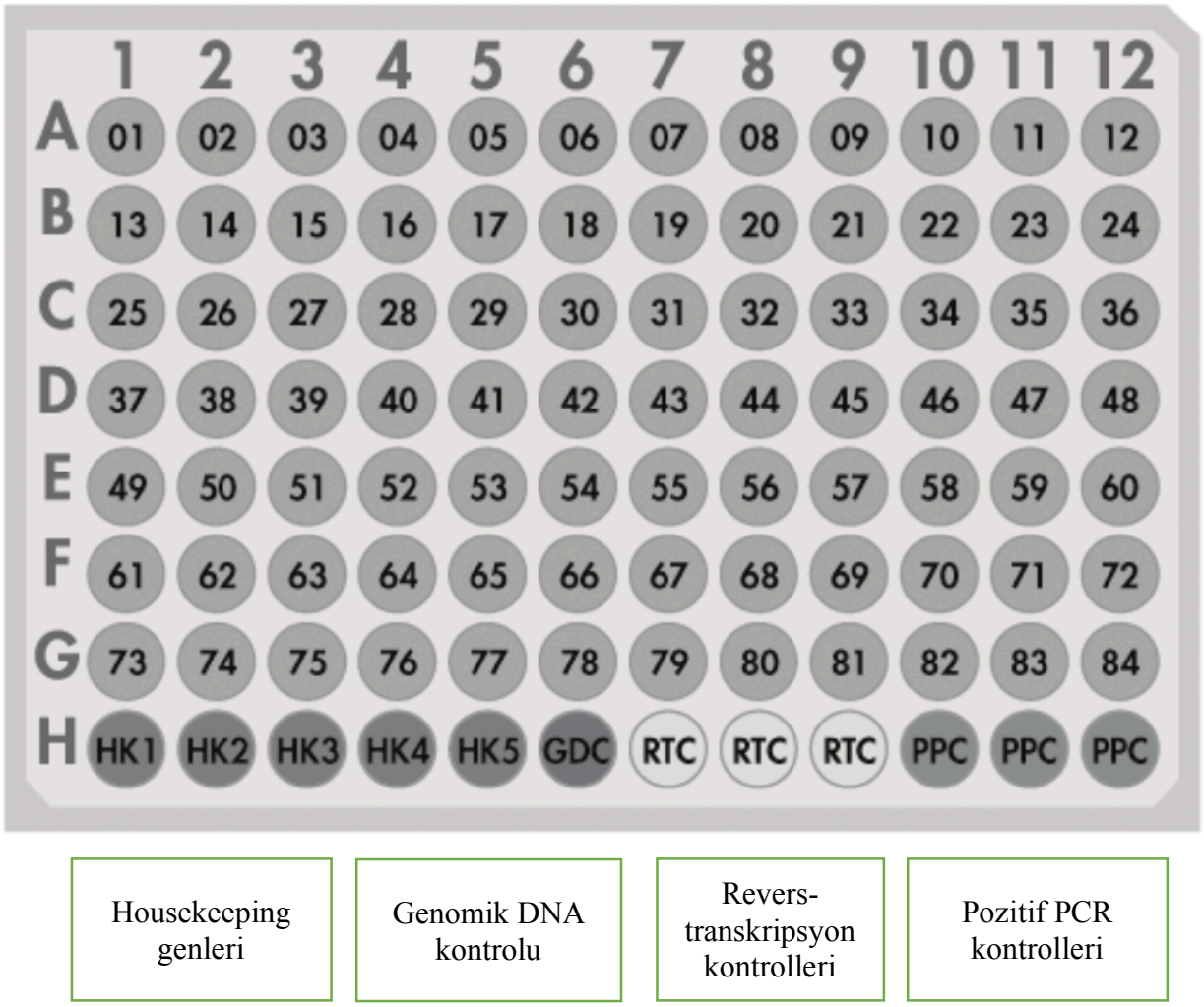
2. Revers-transkripsiyon karışımı hazırlanması:
   Her bir reaksiyon için, 5x BC3 tampondan 4 µl, kontrol P2'den 1 µl, RE3 revers transkriptazdan 2 µl ve RNaz içermeyen sudan 3 µl olmak üzere toplam 10 µl karışım hazırlandı.
3. 10 µl revers-transkriptaz karışımı içeren bir tüpün içine 10 µl DNA eliminasyon karışımından ilave edilip pipet ile karıştırıldı.
4. Karışım 15 dakika 42°C'de inkübe edildi. Süre dolduktan hemen sonra reaksiyonu durdurmak için 5 dakika boyunca 95°C'de inkübe edildi.
5. Her tübe 91 µl RNaz içermeyen su ilave edilip pipet ile defalarca karıştırıldı.
6. Tüpler buzlu ortama bırakılarak soğutuldu.

3.2.10. Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi için izlenmiş prosedürün özeti şekil 3.5'de gösterilmiştir. Bu analiz, Kantitatif Real Time PCR yöntemi ile, apoptozis yolağında görevli 84 gen için tasarlanmış olan Human Apoptosis RT^2 Profiler PCR Array kiti (Qiagen/ Katalog No: PAHS-012Z) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sistem, 96 kuyucuklu plak şeklinde olup apoptozis ile ilişkili 84 gen için spesifik olarak tasarlanmış primerler içermektedir. RT^2 Profiler PCR Array plak deseni Şekil 3.6 de gösterilmiştir. Apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları Tablo 3.6 da yer almaktadır.



Şekil 3.5. Human Apoptosis genes RT^2 Profiler PCR Array Prosedürü (160).



Şekil 3.6. RT^2 Profiler PCR Array plate düzeni (160).

Tablo 3.6. İncelenen apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları

Gen sembolü		Genin açık adı
1	AKT1	Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
2	APAF1	Homo sapiens apoptotic peptidase activating factor 1
3	AVEN	Homo sapiens apoptosis, caspase activation inhibitor
4	BAD	Homo sapiens BCL2-antagonist of cell death
5	BAG1	Homo sapiens BCL2-associated athanogene
6	BAK1	Homo sapiens BCL2-antagonist/killer 1
7	BAX	Homo sapiens BCL2-associated X protein
8	BBC3	Homo sapiens BCL2 binding component 3
9	BCL2	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2
10	BCL2L1	Homo sapiens BCL2-like 1
11	BCL2L10	Homo sapiens BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
12	BCL2L11	Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
13	BCL2L13	Homo sapiens BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
14	BCL2L2	Homo sapiens BCL2-like 2
15	BID	Homo sapiens BH3 interacting domain death agonist
16	BIK	Homo sapiens BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
17	BIRC2	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2
18	BIRC3	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3
19	BIRC5	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 5
20	BOK	Homo sapiens BCL2-related ovarian killer
21	CAD	Homo sapiens carbamoyl-phosphate synt. 2, aspartate transcarb., and dihydroorotase
22	CASP1	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
23	CASP10	Homo sapiens caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
24	CASP12	Homo sapiens caspase 12 (gene/pseudogene)
25	CASP14	Homo sapiens caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
26	CASP2	Homo sapiens caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
27	CASP3	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
28	CASP4	Homo sapiens caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
29	CASP5	Homo sapiens caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
30	CASP6	Homo sapiens caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
31	CASP7	Homo sapiens caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
32	CASP8	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
33	CASP8AP2	Homo sapiens CASP8 associated protein 2
34	CASP9	Homo sapiens caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
35	CFLAR	Homo sapiens CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
36	CRADD	Homo sapiens CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
37	DFFA	Homo sapiens DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
38	DIABLO	Homo sapiens diablo homolog (Drosophila)
39	ENDOG	Homo sapiens endonuclease G
40	FADD	Homo sapiens Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
41	FAM96A	Homo sapiens family with sequence similarity 96, member A
42	FAM96B	Homo sapiens family with sequence similarity 96, member B
43	FAS	Homo sapiens Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
44	FASLG	Homo sapiens Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
45	HMGB1	Homo sapiens high-mobility group box 1
46	HRK	Homo sapiens harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
47	HSP90B1	Homo sapiens heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
48	HTRA2	Homo sapiens HtrA serine peptidase 2

49	LRDD	Homo sapiens leucine-rich repeats and death domain containing
50	MCL1	Homo sapiens myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
51	NFKB1	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
52	NFKB2	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
53	NGFR	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
54	PMAIP1	Homo sapiens phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
55	PTEN	Homo sapiens phosphatase and tensin homolog
56	REL	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
57	RELA	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
58	RELB	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
59	SOCS2	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 2
60	SOCS3	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 3
61	STAT1	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
62	STAT5A	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 5A
63	STAT5B	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 5B
64	TNF	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
65	TNFRSF10A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
66	TNFRSF10B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
67	TNFRSF10C	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
68	TNFRSF11B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
69	TNFRSF1A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
70	TNFRSF1B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
71	TNFRSF21	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
72	TNFRSF25	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
73	TNFSF10	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
74	TNFSF11	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
75	TNFSF8	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
76	TP53	Homo sapiens tumor protein p53
77	TP53I3	Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 3
78	TRAF1	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1
79	TRAF2	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 2
80	TRAF3	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 3
81	TRAF4	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 4
82	TRAF5	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 5
83	TRAF6	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 6
84	TRAF7	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 7

3.2.10.1. Gen Ekspresyon Analizi Aşamaları

PCR karışımının bileşenlerinin hazırlanması amacı ile, 96'lık bir plak için 5 ml'lik bir tüpte, Tablo 3.7'de gösterilen maddeler karıştırıldı. SYBR green mastermiksin içeriği Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. PCR karışımının bileşenleri

madde	***miktar***
2x RT2 Sybr Green Mastermix	1350 µl
Sentezlenmiş cDNA reaksiyonundan	102 µl
RNaz içermeyen su	1248 µl
Total hacim	**2700 µl**

Tablo 3.8 SYBR green mastermiksin içeriği

SYBR green mastermiksin içeriği
HotStart DNA Taq Polimeraz
PCR tamponu
dNTP Karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
SYBR Yeşil Boya
ROX Pasif Referans Boyası

1. Hazırlanmış PCR bileşenleri karışımı PCR RT^2 Profiler PCR Array plağına 8 kanallı pipet kullanılarak kuyucuk başına 25 µl olacak şekilde dağıtıldı.
2. Plağın üzeri ''optikal-8 cap'' filmi ile kapatıldı.
3. Kabarcıkları uzaklaştırmak için plaklar 1 dakika 1000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
4. Real-time cycler cihazı döngü koşulları Tablo 3.9'da yer almıştır.

Tablo 3.9 PCR için döngü koşulları

Döngü sayısı	**Süre**	**ısı**	**Açıklama**
1	10 dakika	95 °C	DNA Taq Polimerazın aktifleştirilmesi
40	15 saniye 1 dakika	95 °C 60 °C	Fluresans veri toplama

5. Plak cihaza yerleştirilip kapağı kapatıldıktan sonra başlatıldı.

6. ‘Real time cycler’ yazılımı kullanarak her kuyucuk için threshold döngü (C_T) hesaplandı.
7. Amplifikasyon planının lineer kısmında gözüken en erken amplifikasyon bulunup baseline olarak tanımlandı. Cihaz, gözüken en erken amplifikasyondan 2 döngü öncesinden itibaren okumaya ayarlandı.
8. Amplifikasyon planının log bölümünde, threshold değeri belirlendi. Threshold değerinin arkaplan sinyalinin üst kısmında fakat lineer fazın alt yarı kısmında olması gerekmektedir. Threshold değerinin tüm array ranlarının üzerinden geçmesine dikkat edildi.
9. Tüm kuyucukların C_T değerleri veri analizi için toplandı.
10. PCR’ın spesifitesini doğrulamak için, ‘melting curve analizi’ yapıldı. Bunun için, real-time cycler yazılımı kullanılarak her kuyucuk için Birinci türev ayrışma eğrisi (first derivative dissociation curve) oluşturuldu. Her reaksiyon için 80 °C’nin üzerinde tek bir pik gözlemlendi.

3.2.10.2. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Veri Analizi

Veri analizi $\Delta\Delta C_T$ metodu ile gerçekleştirildi. Gruplarında ayrı ayrı PCR sonrasında SDS 2,3 programı kullanılarak elde edilen C_T değerleri analiz edildi. Cut off değeri 35 olduğundan 35’den büyük olan CT değerleri 35’e sabitlendi. Kontrol kuyucukları Tablo 3.10’da gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Kontrol için kullanılan genler

Kuyucuk kodu	***Açıklama***
H6	İnsan Genomik DNA kontrolü (HGDC)
H7 H8 H9	Ters transkripsiyon kontrolü (RTC)
H10 H11 H12	PCR pozitif kontrol (PPC)

Normalizasyon yapmak amacıyla, apoptozis yolağında görevli genler (GOA) için her bir plakda C_T değerleri kullanılarak ilgili genler ve housekeeping genler (HKG) için ΔC_T değerleri $\Delta C_T = C_T^{GOA} - C_T^{ort\ HKG}$ formülü kullanılarak hesaplandı. İki grup RT^2 Profiler PCR Array arasında, her bir gen için $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplandı. Formül:

''$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (ZA uygulanmış hücre grubu) – ΔC_T (ZA uygulanmamış, kontrol hücreler)''

3.2.10.3. Veri Analizinin Yorumlanması

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (ilaç uygulanmış hücreler) – ΔC_T (ilaç uygulanmamış kontrol hücreler)

- $1<\Delta\Delta C_T<2$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta up-regüle olduğu ihmal edilebilir
- $2<\Delta\Delta C_T$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta up-regüledir (ekspresyon artmış).
- $0.5<\Delta\Delta C_T<1$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta down-regüle olduğu ihmal edilebilir
- $\Delta\Delta C_T < 0,5$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta down-regüledir.

Her gen için ilaç uygulanmış grupta ilaç uygulanmamış kontrol grubuna göre kat değişimi (FC), $2^{(-Avg\Delta CT)}$) formülü kullanılarak hesaplandı.

Kat değişimi değeri 3'ün üstünde ve -3'ün altında olan genler sırasıyla en anlamlı up-regüle ve en anlamlı down-regüle olan genler olarak tanımlandı.

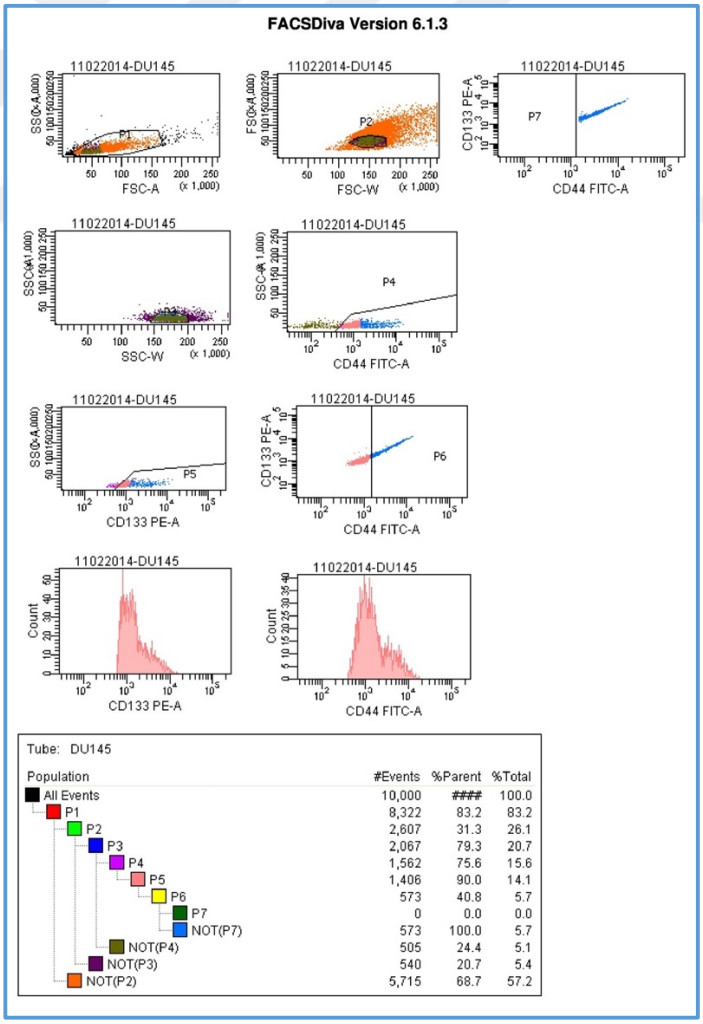
3.3. İstatiksel Analiz

Deneylerde ZA'in sitotoksisite, apoptoz, hücre döngüsü ve gen ekspresyonu analizlerinde her deney üç kez tekrarlandı. ZA ile muamele edilmiş hücreler ile edilmemiş kontrol hücreler arasında anlamlı farklılığın olup olmadığı ve standart sapma değerleri t-test yöntemi ile araştırıldı. Gruplar arasında verilerin karşılaştırılması için tek yönlü ANOVA ve ardından HSD post hoc testleri uygulandı. Karşılaştırmalarda 0.05'ten küçük p değeri ($P < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

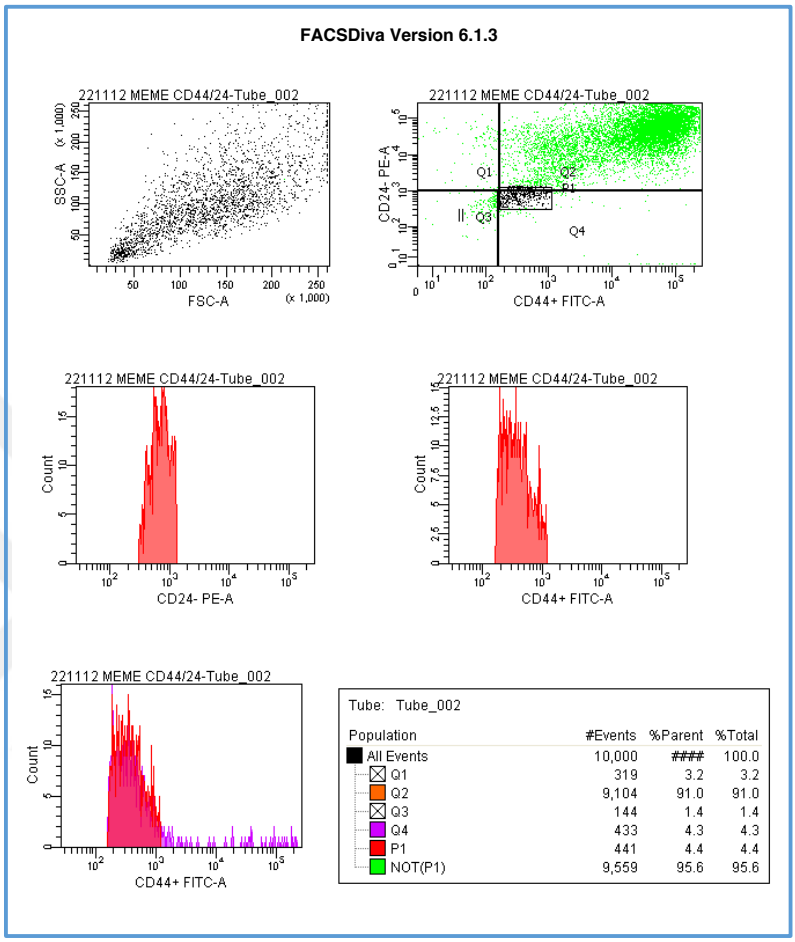
BÖLÜM IV
4. BULGULAR

4.1. KKH'lerin ayırımı, oran ve saflığının belirlenmesi:

İnsan prostat kanseri DU-145 hücreleri ve insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde CD133, CD44 ve CD24 yüzey antijenleri için FACS ile sort yapıldı (Şekil 4.1 ve 4.2). DU-145 KKH hücrelerinin oranı %5.7, non-KKH'lerinin ise %94.3 idi (Şekil 4.1). MCF-7 hücrelerinde KKH'lerinin oranı %4.4 ve non-KKH'lerin oranı %95.6 idi. Hücre popülasyonlarının saflığını belirlemek için 'post sort' analizi yapılarak saflığın >%90 olduğu tespit edildi.



Şekil 4.1. CD133^{+}/CD44^{+} prostat kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayırılması.



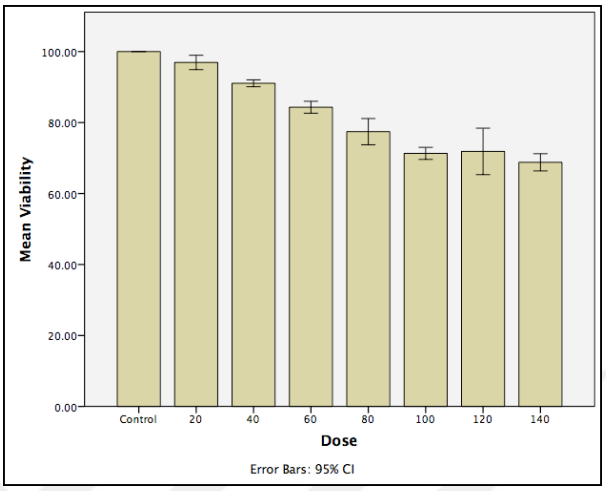
Şekil 4.2. CD44^{+}/CD24^{-} meme kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayırılması.

4.2. Canlılık/Viabilite Bulguları

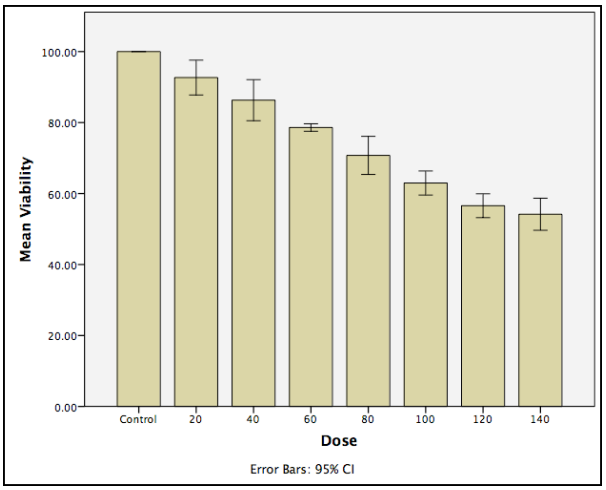
4.2.1. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe ZA'in sitotoksik etkilerinin incelenmesi

Zoledronik asidin DU-145 insan prostat kanser kök hücreleri (DU-145 KKH) ve kanser kök hücre dışında kalan hücrelerin (DU-145 non-KKH) canlılığı üzerine etkileri, artan dozlara (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM) ve zamanlara (24,

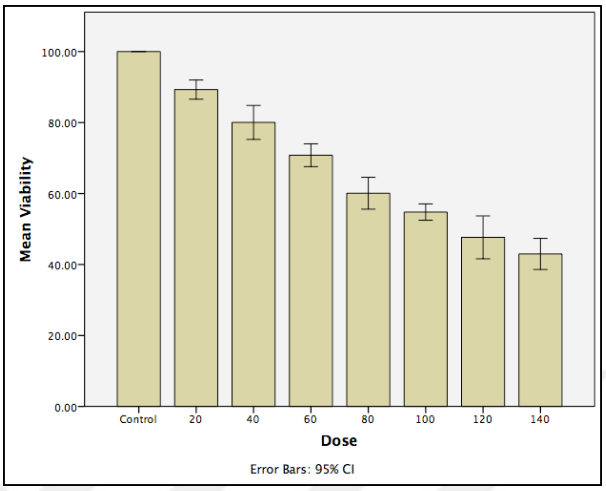
48 ve 72 saat) bağlı olarak incelendi. Bu bulgular Şekil 4.3 – 4.8' ve 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

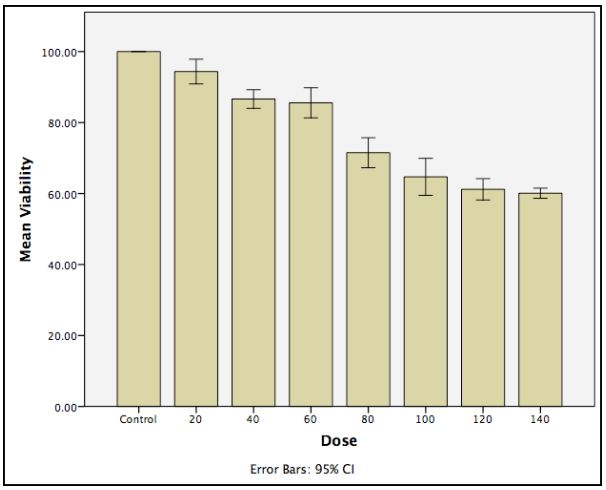


Şekil 4.4. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

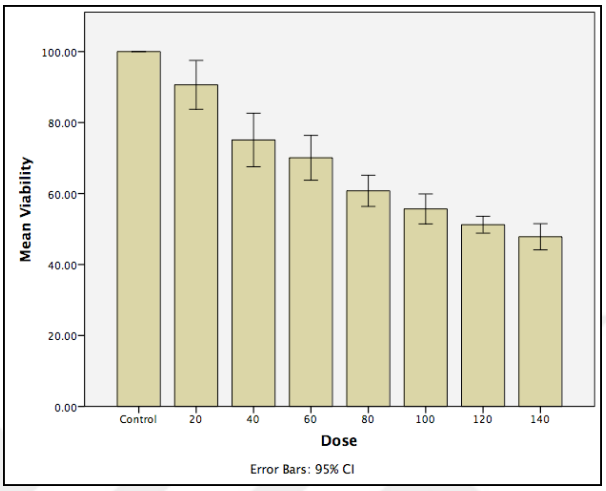


Şekil 4.5. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

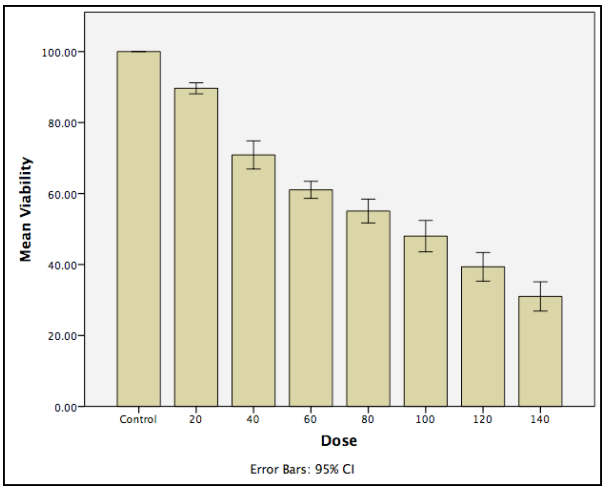
ZA ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM ZA konsantrasyonlarında sırası ile %96.94, %91.07, %84.32, %77.44, %71.32, %71.87 ve %68.79 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.3). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %92.68, %86.31, %78.61, %70.75, %62.97, %56.57 ve %54.17 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.4). 72. saatte ise DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında aynı konsantrasyonlarda sırası ile %89.29, %80.04, %70.80, %60.08, %54.78, %47.65 ve %42.98 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.7. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

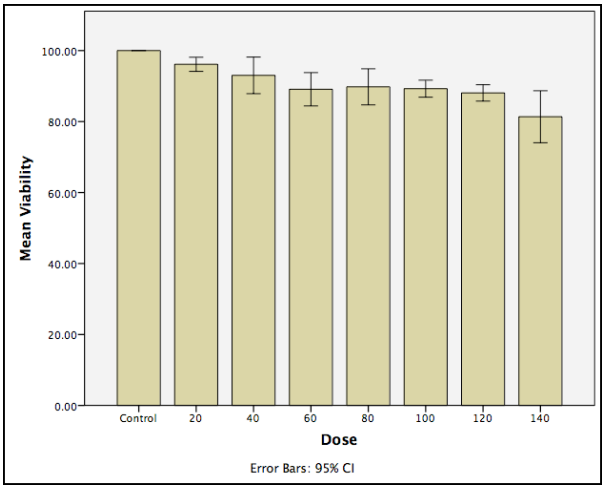


Şekil 4.8. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

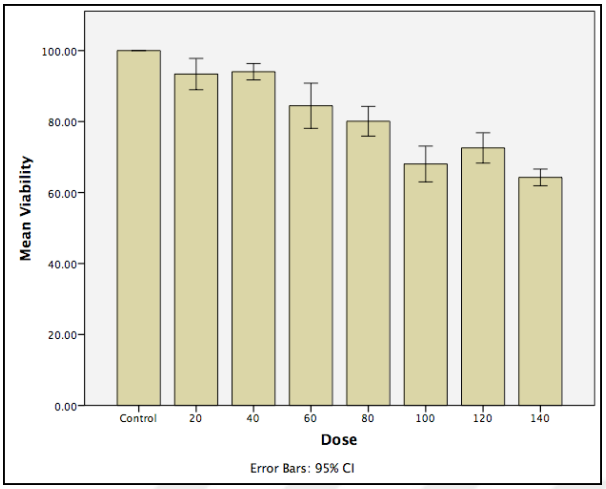
Zoledronik asid ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 non-KKH'leri kontrol ile kıyasladığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM ZA konsantrasyonlarında sırası ile %94.37, %86.63, %85.57, %71.51, %64.70, %61.19 ve %60.09 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.6). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %90.63, %75.09, %70.07, %60.77, %55.67, %51.22 ve %47.82 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.7). 72. saatte ise DU-145 non-KKH'leri kontrol ile kıyasladığında aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %89.65, %70.88, %61.04, %55.07, %48, %39.35 ve %31.01 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.8).

4.2.2. MCF-7 İnsan meme kanseri hücre kültüründe ZA'in sitotoksik etkileri

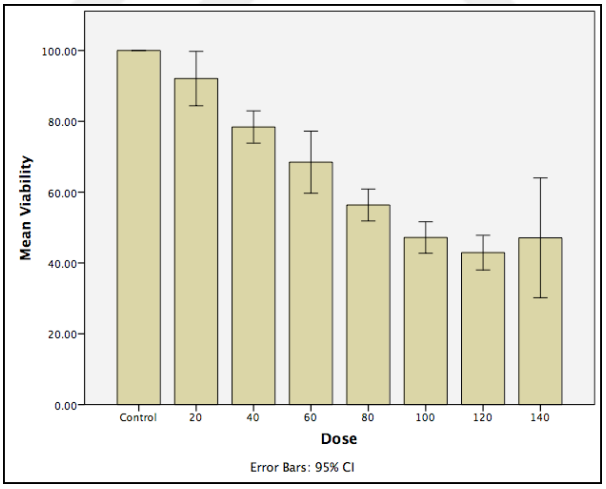
Zoledronik asidin MCF-7 insan meme kanser kök hücreler (MCF-7 KKH) ve kanser kök hücresi dışında kalan hücrelerin ((MCF-7 non-KKH) canlılığı üzerine etkileri, artan dozlara (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM) ve zamanlara (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak incelendi. Bu bulgular Şekil 4.9 – 4.14 ve 4.15'de gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte MCF-7 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.



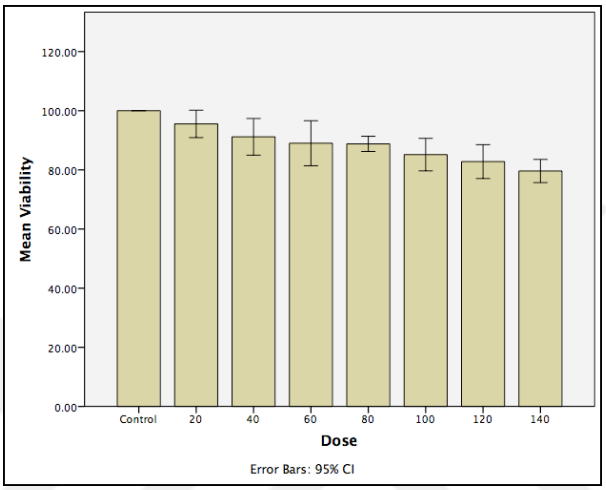
Şekil 4.10. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte MCF-7 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



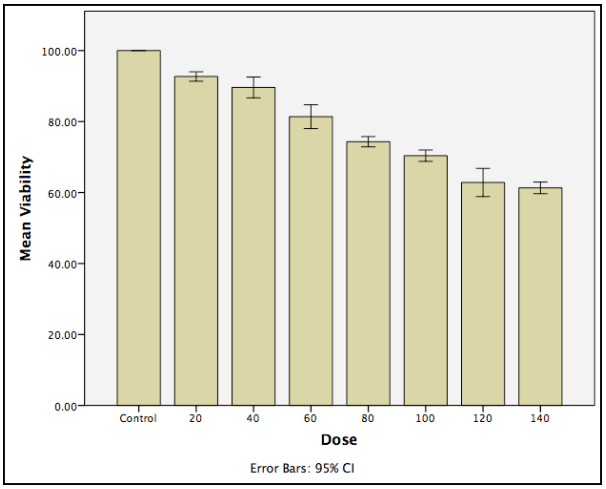
Şekil 4.11. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte MCF-7 KKH'lerde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

Zoledronik asid ile 24 saat muamele sonunda, MCF-7 KKH'leri kontrol ile kıyasladığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM ZA konsantrasyonlarında sırası ile %96.13, %93.02, %89.10, %89.78, %89.26, %88.07 ve %81.36 viabilite saptandı (Şekil 4.9). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında

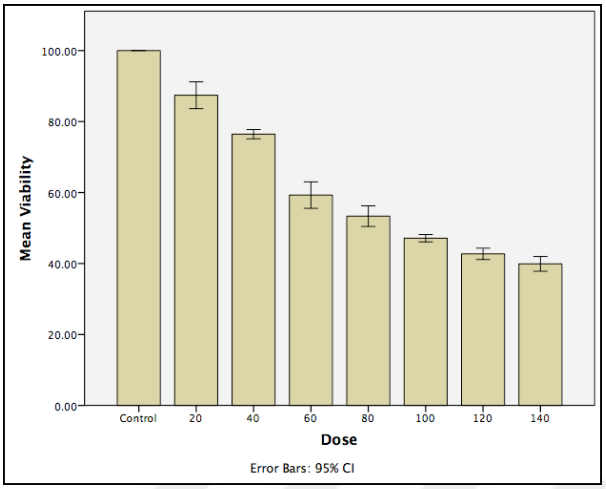
sırası ile %93.38, %94.04, %84.45, %80.09, %68.05, %72.57 ve %64.27 viabilite saptandı (Şekil 4.10). 72. saatte ise MCF-7 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında bu değerler sırası ile %92.07, %78.40, %68.46, %56.37, %47.19, %42.93 ve %47.10 olarak belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

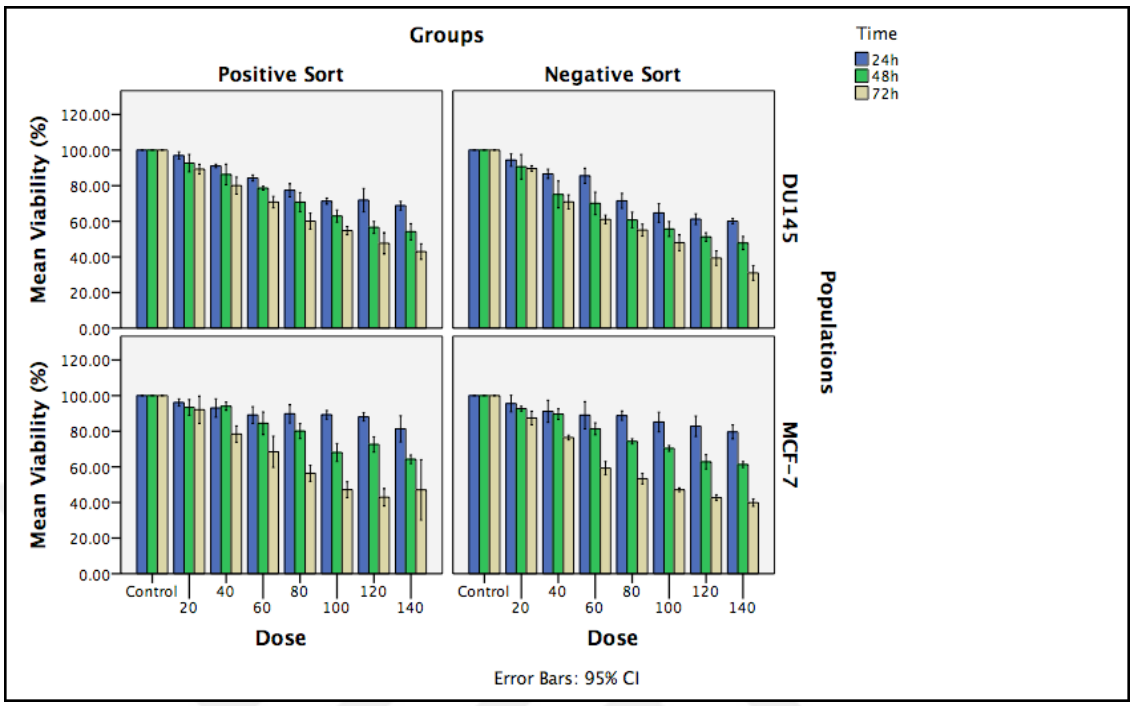


Şekil 4.13. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.14. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

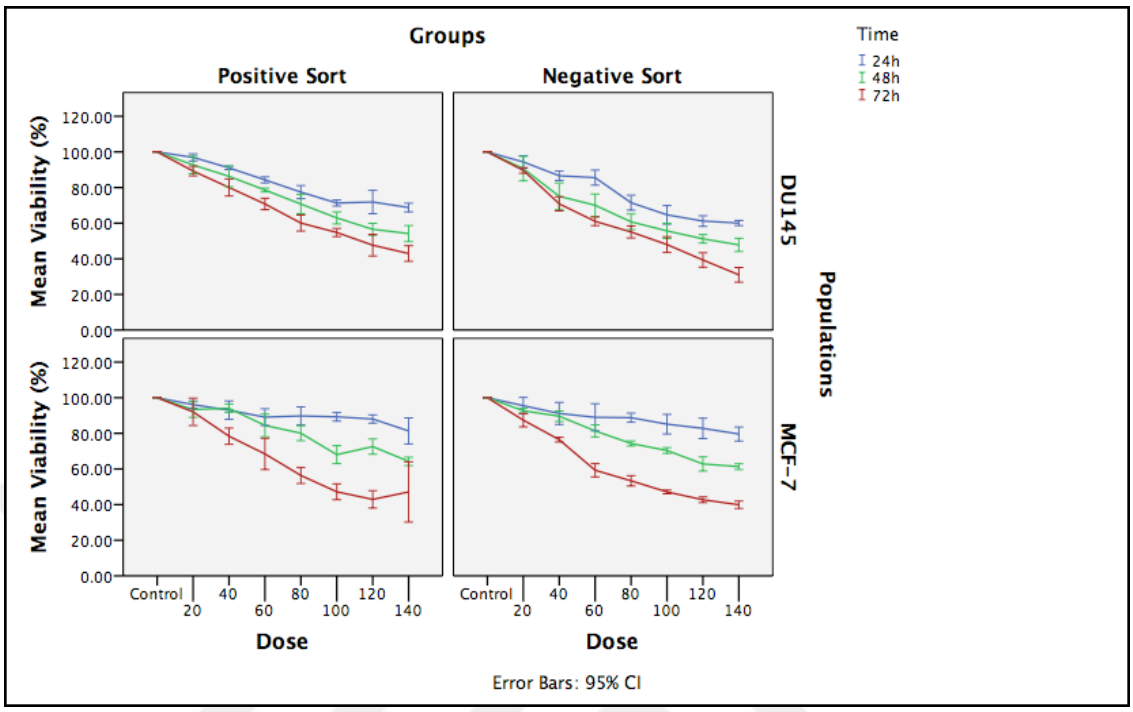
Zoledronik asid ile 24 saat muamele sonunda, MCF-7 non-KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM konsantrasyonlarında sırası ile %95.55, %91.18, %89.01, %88.79, %85.16, %82.80 ve %79.62 oranlarında viabilite değerleri bulundu (Şekil 4.12). 48 saat muamele sonunda bu oranlar sırası ile %92.70, %89.62, %81.37, %74.32, %70.38, %62.83 ve %61.31 idi (Şekil 4.13). 72. Saatte ise MCF-7 non-KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında sırası ile %87.42, %76.45, %59.28, %53.35, %47.13, %42.72 ve %39.90 viabilite oranları saptandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.15. ZA'in farklı doz ve sürelerde tüm gruplarda elde edilen hücre canlılığı değerleri. *Positive sort: KKHleri, Negative sort: non-KKHleri*

4.3. IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

Viabilite sonuçlarına göre her bir grup için IC_{50} değeri hesaplandı. Buna göre prostat kanseri DU-145 KKH'leri için IC_{50} değeri 108 µM ve 72 saat, DU-145 non-KKH'leri için 96 µM ve 72 saat olarak hesaplandı. Meme kanseri MCF-7 hücreleri için ise, KKH'lerinde IC_{50} değeri 94 µM ve 72 saat ve non-KKH'lerinde 92 µM ve 72 saat olarak hesaplandı.



Şekil 4.16. Tüm gruplarda ZA'in giderek artan doz ve sürelerde elde edilen hücre canlılığı değerleri ve IC_{50} değerlerini gösteren grafikler.

4.4. Apoptozis deneyleri bulguları

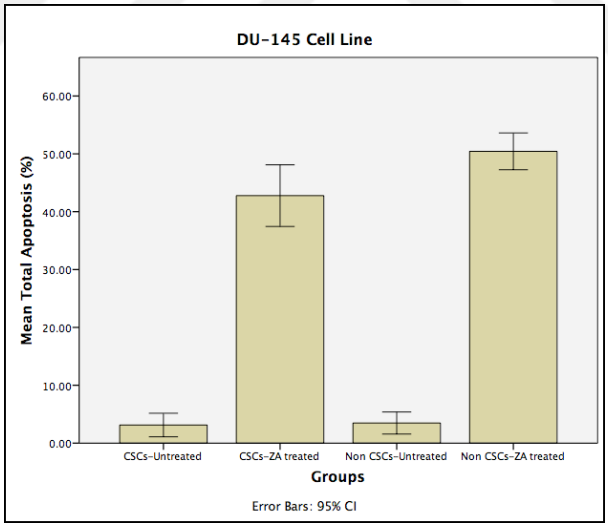
4.4.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri

Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerinde ve DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığına olan etkilerinin apoptoza bağlı olup olmadığı incelendi. ZA'in bu hücreler üzerine apoptotik etkisi Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile belirlendi. Apoptotik etki canlı hücreler (live cells), erken apoptotik hücreler (early apoptosis), geç apoptotik hücreler (late apoptosis) ve ölmüş hücreler (dead cells) üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.17 – 4.20'de gösterilmiştir.

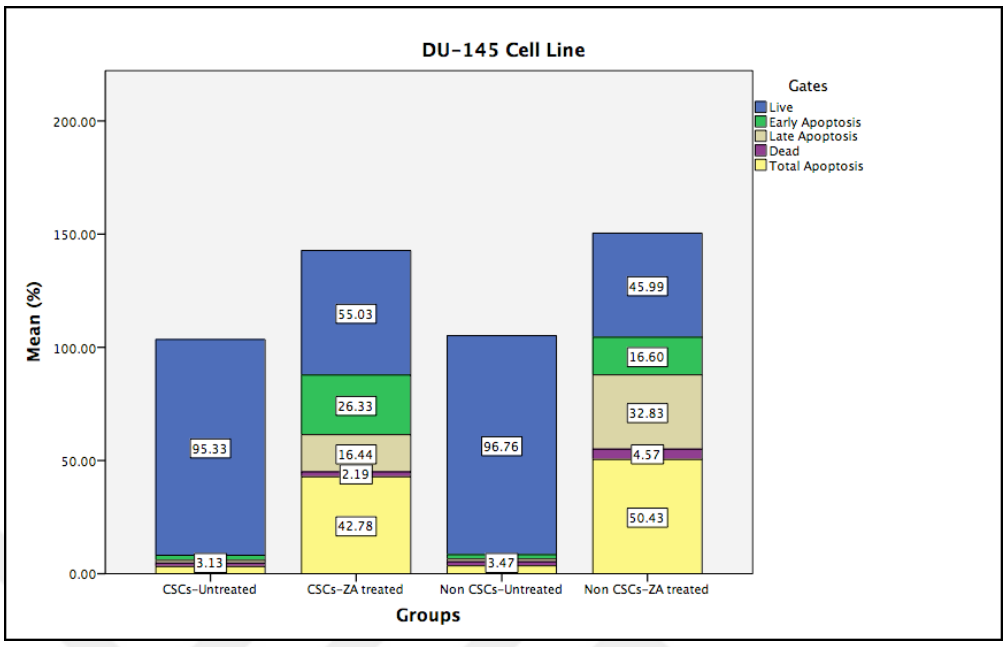
Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC_{50} değerine (108 µM, 72 saat) paralel olarak ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (ZA ile muamele edilen KKH'leri: %42.78, edilmeyenler %3.13, $p<0.001$, Şekil 4.17 ve 4.18). ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerindeki erken apoptotik yüzde değeri ZA ile

muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile %26.33 ve %2.24, p<0.001, Şekil 4.18). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değeri de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (sırası ile %16.44 ve %1.22, p<0.001, Şekil 4.18).

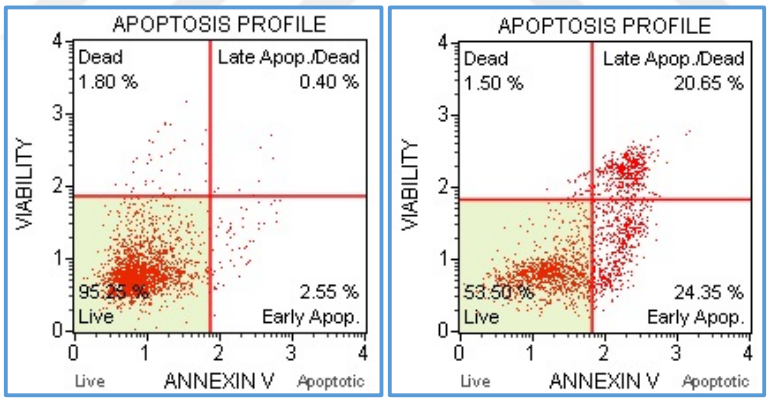
Zoledronik asidin DU-145 non-KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC_{50} değerinde (96 μM, 72 saat) ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (sırası ile: %50.43 ve %3.47, p<0.001, Şekil 4.17 ve 4.18). Erken apoptotik yüzde değerinde de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (sırası ile: %16.60 ve %1.91, p<0.001, Şekil 7.18). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değeri de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile: %32.83 ve %1.23, p<0.001, Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Zoledronik asidin IC_{50} dozu (108 μM) ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan ''total apoptosis'' değerleri.

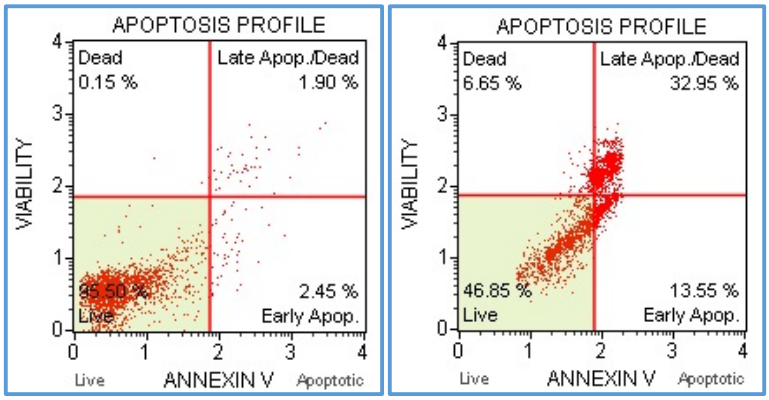


Şekil 4.18. Zoledronik asidin IC50 dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.



Kontrol ZA-Uygulanmış

Şekil 4.19. Zoledronik asidin IC_{50} dozu ile 72 saat muamele edilen (108 µM) DU-145 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.



Kontrol ZA-Uygulanmış

Şekil 4.20. Zoledronik asidin IC_{50} değerindeki dozuyla 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptosis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.

4.4.2. İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri

Zoledronik asidin MCF-7 KKH'lerinde ve MCF-7 non-KKH'lerinde hücre canlılığına olan etkilerinin apoptozise bağlı olup olmadığı incelendi. ZA'in bu hücreler üzerine apoptotik etkisi Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile belirlendi. Apoptotik etki canlı hücreler (live cells), erken apoptotik hücreler (early apoptosis), geç apoptotik hücreler (late apoptosis) ve ölmüş hücreler (dead cells) üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.21 – 4.24'de gösterilmiştir.

KKH'leri

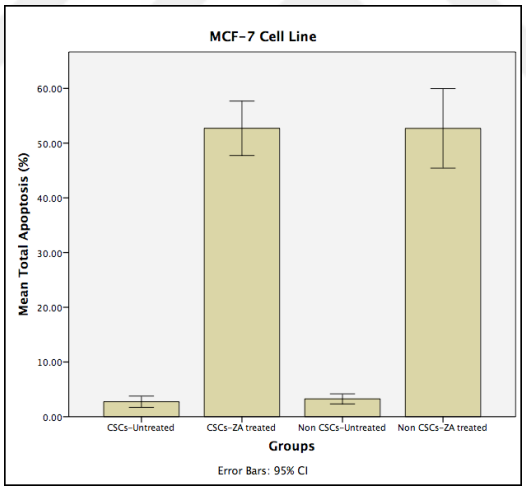
Zoledronik asidin MCF-7 KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC_{50} değerine (94 µM, 72 saat) paralel olarak ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa yol açtığı tespit edildi (ZA ile muamele edilen MCF-7 KKH'lerinde %52.72, edilmeyenlerde %2.74, $p<0.001$, Şekil 4.21 ve 4.22). Erken apoptotik yüzde değerleri ZA ile muamele edilen MCF-7 KKH'lerinde edilmeyenlere göre anlamlı artmış bulundu (sırası ile: %28.74 ve %0.89, $p<0.001$, Şekil 4.21). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değerleri de ZA ile muamele edilen

MCF-7 KKH'lerinde edilmeyenlere göre anlamlı artmış bulundu (%23.98 ve %1.85, p<0.001, Şekil 4.22).

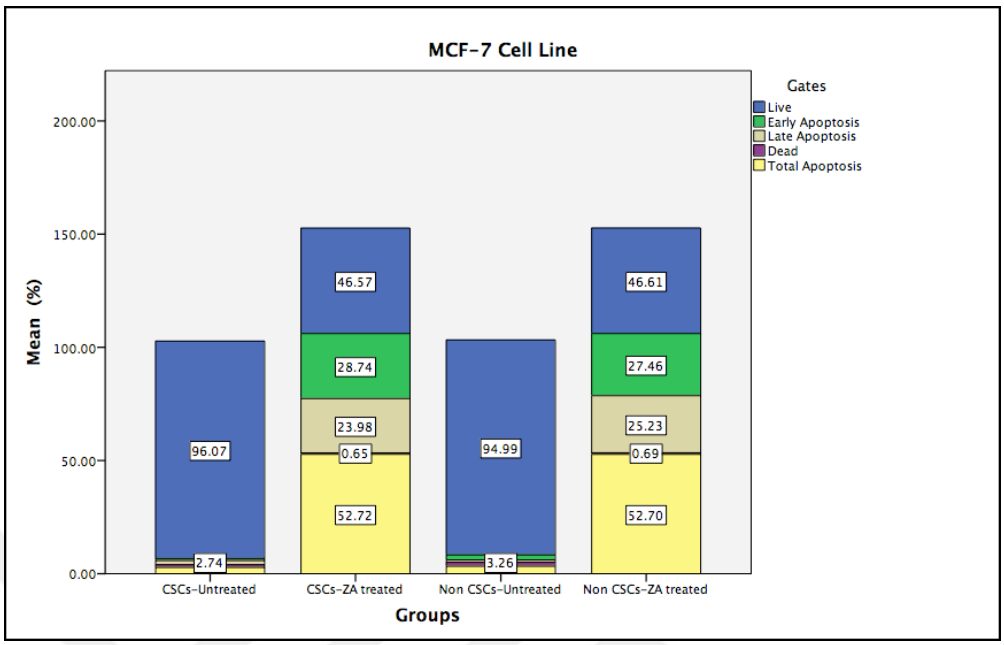
Non-KKH'leri

Zoledronik asidin MCF-7 non-KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC_{50} değerine (92 µM, 72 saat) paralel olarak ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa yol açtığı tespit edildi (ZA ile muamele edilen MCF-7 non-KKH'lerinde %52.70, edilmeyenlerde %3.26, p<0.001, Şekil 4.21 ve 4.22).

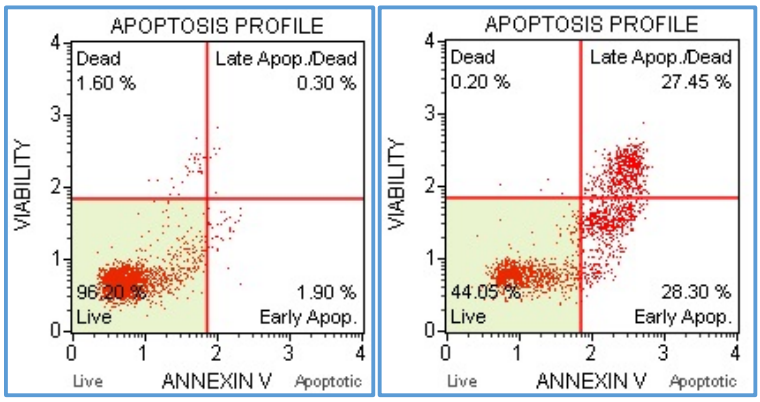
Erken apoptotik yüzde değeri ZA ile muamele edilen MCF-7 non-KKH'lerinde %27.46, edilmeyenlerde %2.19 olarak saptandı (p<0.001, Şekil 4.21). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değeri ZA ile muamele edilen MCF-7 non-KKH'lerinde %25.23 edilmeyenlerde %1.06 idi (p<0.001, Şekil 4.22).



Şekil 4.21. MCF-7 KKH ve non-KKH'lerinde IC_{50} değerindeki doz-süre ile zoledronik asid muamelesi sonucunda bulunan ''total apoptozis'' değerleri.

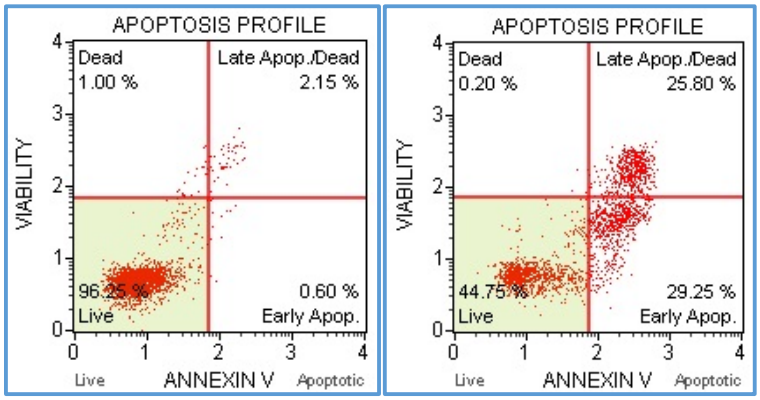


Şekil 4.22. MCF-7 KKH ve non-KKH'lerinde IC_{50} değerindeki doz-süre ile zoledronik asid muamelesi sonucunda bulunan apoptotik değerler.



Kontrol ZA-Uygulanmış

Şekil 4.23. Zoledronik asid'in 72. saatte IC_{50} değerindeki dozuyla muamele edilen MCF-7 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz yüzde değerlerini gösteren bir örnek.



Kontrol ZA-Uygulanmış

Şekil 4.24. Zoledronik asidin 72. saatte IC_{50} değerindeki dozuyla muamele edilen MCF-7 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz yüzde değerlerini gösteren bir örnek.

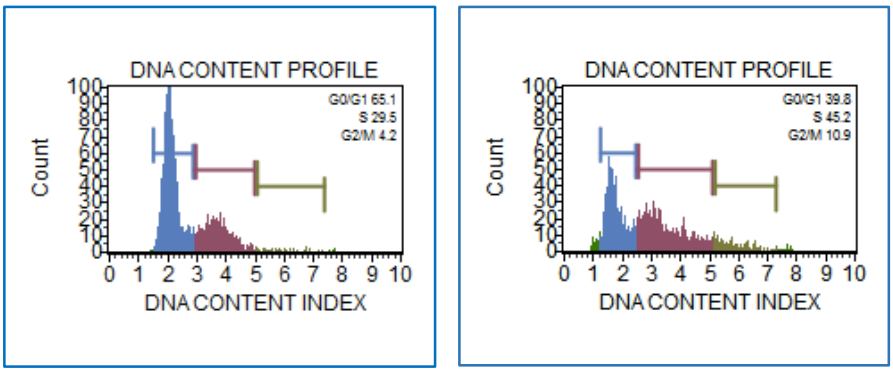
4.5. Hücre döngüsü deneyleri bulguları

DU-145 KKH, DU-145 non-KKH, MCF-7 KKH ve MCF-7 non-KKH hücrelerinde belirlenen IC_{50} doz-süre değerlerinde zoledronik asid ile muamele edilmesinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri Muse™ Cell Cycle kiti ile incelendi. Bu yöntemde G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin yüzdeleri belirlenerek değerlendirmeler yapıldı.

4.5.1. DU-145 hücrelerinde Zoledronik asidin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

KKH'leri

Belirlenen IC_{50} doz-süre değerlerinde ZA ile muamele DU-145 prostat KKH'lerinde G0/G1 fazında anlamlı bir azalmaya, S ve G2/M fazlarında ise anlamlı bir artışa neden oldu. Kontrol (ZA ile muamele edilmemiş) ve ZA ile muamele edilmiş hücrelerin G0/G1 değerleri sırasıyla %65.23±1.05 ve % 40.89±1.56 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.001) olarak hesaplandı. Kontrol ve ZA uygulanan grubun S fazı değerleri sırasıyla %31.32±1.40 ve %46.68±0.90 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.006) olarak hesaplandı. Kontrol ve ilaç uygulanan grubun G2/M değerleri sırasıyla %2.96±0,92 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.008) ve %9.66±0.62 olarak hesaplandı.

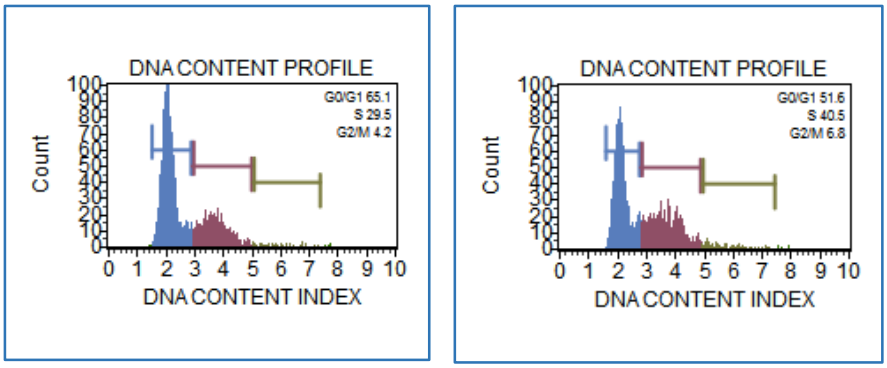


Kontrol ZA uygulanmış

Şekil 4.25. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen DU-145 prostat KKH'lerine ait DNA histogramı.

Non-KKH'leri

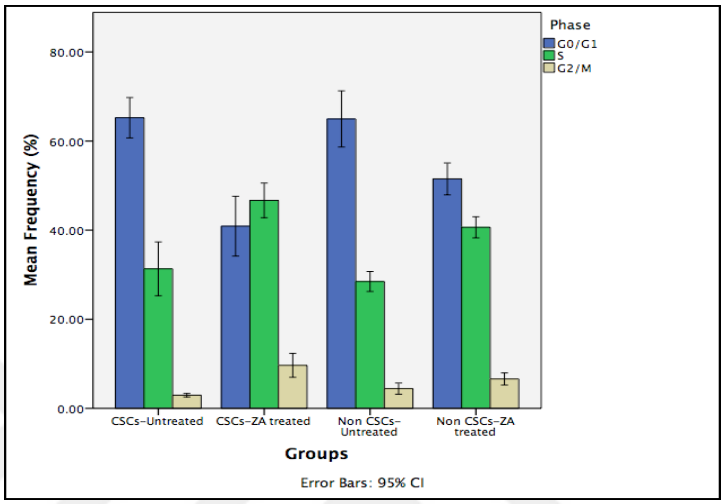
Belirlenen IC_{50} doz-süre değerlerinde ZA ile muamele DU-145 prostat non-KKH'lerinde G0/G1 fazında anlamlı bir azalmaya, S ve G2/M fazlarında ise anlamlı bir artışa neden oldu. Kontrol ve ilaç uygulanan grupların G0/G1 değerleri sırasıyla %64.96±1.46 ve %51.51±0.83 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.028) olarak hesaplandı. Kontrol ve ilaç uygulanan grupların S fazı değerleri sırasıyla %28.47±0.52 ve % 40.64±0.55 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.005) olarak saptandı. Kontrol ve ilaç uygulanan grupların G2/M değerleri sırasıyla %4.44±0.29 ve % 6.6±0.32 (Ortalama ± Standart sapma, p=0.010) olarak hesaplandı.



Kontrol ZA uygulanmış

Şekil 4.26. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen DU-145 prostat non-KKH'lerine ait DNA histogramı.

Zoledronik asidin hücre döngüsü üzerindeki etkisinin prostat kanseri DU-145 KKH'lerinde non-KKH'lerine göre daha yüksek olduğu gözlendi (p=0.008, p=0.012, p=0.035, şekil 2.27)

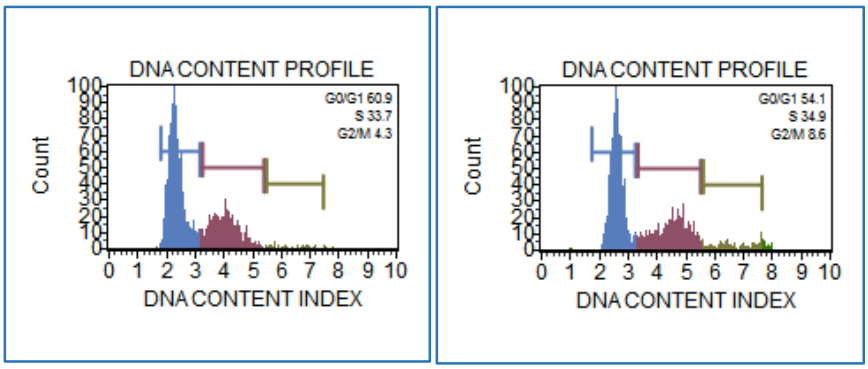


Şekil 4.27. Zoledronik asid ile 72 saat süre ile inkübe edilen DU-145 KKH'lerinde ve non-KKH'lerinde doza bağlı olarak G0/G1, S ve G2/M fazlarında neden olduğu değişimler.

4.5.2. MCF-7 hücrelerinde Zoledronik asidin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

KKH'leri

Belirlenen IC_{50} doz-süre değerlerinde ZA ile muamele meme MCF-7 KKH'lerinde G0/G1 fazında anlamlı bir azalmaya, S ve G2/M fazlarında ise anlamlı bir artışa neden oldu. Kontrol (ZA ile muamele edilmemiş) ve ZA ile muamele edilmiş hücrelerin G0/G1 değerleri (ortalama ± standart sapma) sırası ile %62.92±1.01 ve % 55.34±0.87 olarak hesaplandı. Kontrol ve ilaç uygulanan grubun S fazı değerleri sırasıyla %31.75±1.11 ve %37.49±0.73 olarak bulundu. Kontrol ve ilaç uygulanan grubun G2/M değerleri sırasıyla % 5.43± 0.70 ve % 7.53±0.78 olarak hesaplandı. Tüm değerler cinsindendir.

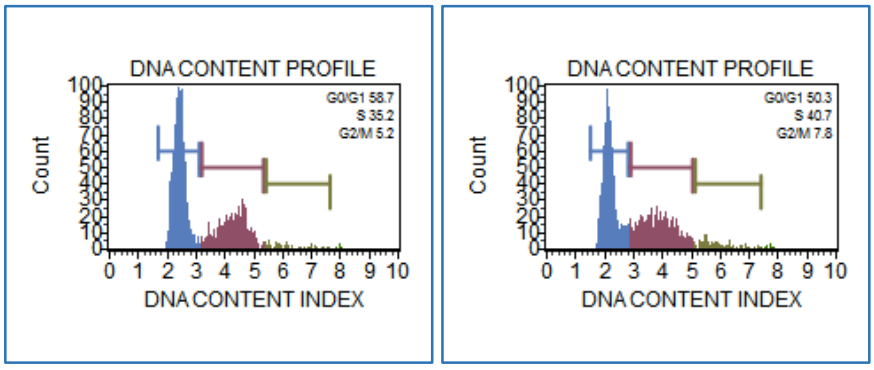


Kontrol ZA uygulanmış

Şekil 4.28. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 meme KKH'lerine ait DNA histogramı.

Non-KKH'leri

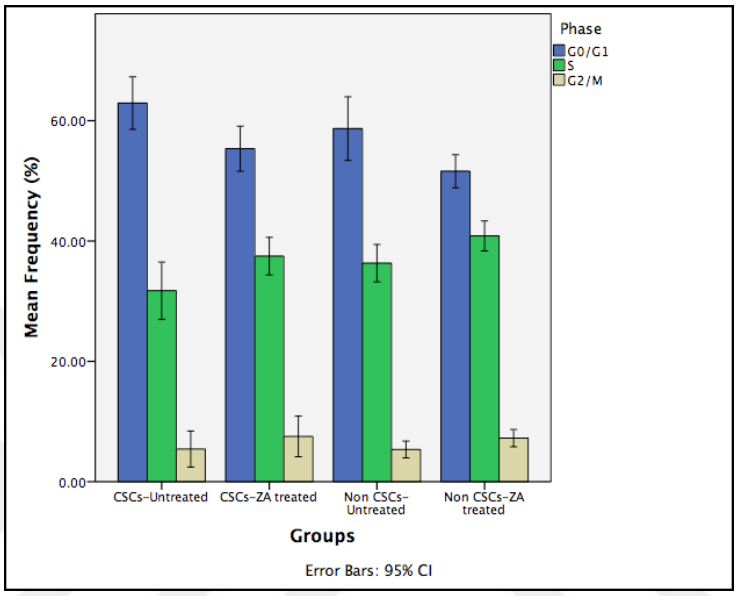
Belirlenen IC_{50} doz-süre değerlerinde ZA ile muamele meme MCF-7 non-KKH'lerinde G0/G1 fazında anlamlı bir azalmaya, S ve G2/M fazlarında ise anlamlı bir artışa neden oldu. Kontrol (ZA ile muamele edilmemiş) ve ZA ile muamele edilmiş hücrelerin G0/G1 değerleri sırasıyla % 58.68±1.23 ve % 51.60±0.64 olarak hesaplandı. Kontrol ve ilaç uygulanan grupların S fazı değerleri sırasıyla %36.32±0.72 ve %40.85±0.58, G2/M değerleri sırasıyla %5.36±0.32 ve %7.24±0.34 olarak belirlendi.



Kontrol ZA uygulanmış

Şekil 4.29. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 meme non-KKH'lerine ait DNA histogramı.

Zoledronik asidin meme kanseri MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin KKH'leri ve non-KKH'leri arasında anlamlı bir fark göstermediği belirlendi (p=0.115, p=0.099, p=0.824, Şekil 4. 30).



Şekil 4.30. Zoledronik asid ile 72 saat inkübe edilen MCF-7 KKH'lerinde ve non-KKH'lerinde doza bağlı olarak G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimler.

4.6. Gen ekspresyon deneyleri

4.6.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Gen ekspresyonunu incelemek amacı ile Human Cell RT^2 Profiler^{TM} PCR Array Kiti (SABiosciences, PAHS-405F-12) kullanıldı ve test sonuçları kitin satın alındığı firmanın yazılımıyla analiz edildi. Kısaca, gruplardaki gen ifade değişimleri, baz alınan kontrol grubundaki değişimlerin katı cinsinden belirlendi. Kat değişim (FC-Fold change) analizi yapılarak 3'den büyük kat değişimleri her bir prob için anlamlı artış ve azalış olarak belirtildi. Bulgular Tablo 4.1ve 4.2 de verilmiştir.

KKH'leri

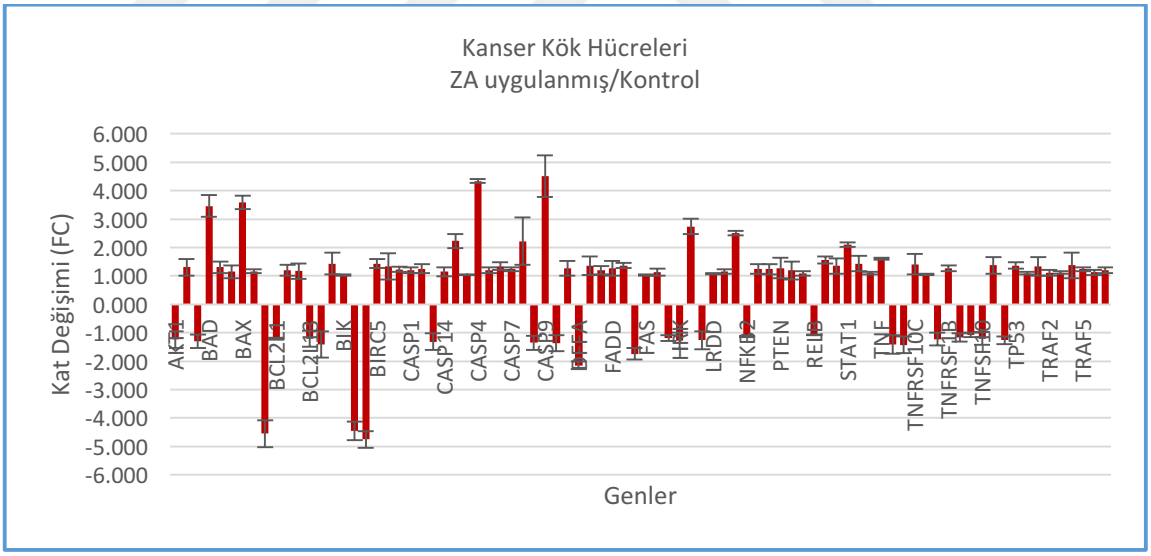
DU-145 KKH'leri IC_{50} dozunda 72 saat boyunca ZA ile inkübe edilerek apoptoz ile ilişkili olan genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile incelendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 6 gende anlamlı değişim gözlendi. *CASP9*, *CASP4, BAX* ve *BAD* genlerinin ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = 4.507 ± 0.73, 4.339 ± 0.07, 3.589 ± 0.23 ve 3.458± 0.38, Tablo 4.2 ve Şekil 4.31). *BIRC3*, *BIRC2* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = -4.755 ± 0.30, -4.449 ± 0.32 ve -4.545 ± 0.47, Tablo 4.1 ve Şekil 4.31).

Tablo 4.1. IC_{50} dozu ve 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

Gen Sembolu		Ortalama ± Standart sapma	
1	AKT1	-1.240	±0.29
2	APAF1	1.309	±0.29
3	AVEN	-1.300	±0.23
4	BAD	3.458	±0.38
5	BAG1	1.306	±0.21
6	BAK1	1.146	±0.23
7	BAX	3.589	±0.23
8	BBC3	1.160	±0.07
9	BCL2	-4.545	±0.47
10	BCL2L1	-1.208	±0.03
11	BCL2L10	1.204	±0.20
12	BCL2L11	1.172	±0.27
13	BCL2L13	-1.199	±0.28
14	BCL2L2	-1.415	±0.46
15	BID	1.436	±0.38
16	BIK	1.035	±0.02
17	BIRC2	-4.449	±0.32
18	BIRC3	-4.755	±0.30
19	BIRC5	1.431	±0.16
20	BOK	1.334	±0.46
21	CAD	1.232	±0.09
22	CASP1	1.204	±0.10

23	CASP10	1.252	±0.16
24	CASP12	-1.313	±0.29
25	CASP14	1.149	±0.15
26	CASP2	2.226	±0.25
27	CASP3	1.049	±0.02
28	CASP4	4.339	±0.07
29	CASP5	1.196	±0.10
30	CASP6	1.343	±0.14
31	CASP7	1.241	±0.07
32	CASP8	2.222	±0.83
33	CASP8AP2	-1.354	±0.26
34	CASP9	4.507	±0.73
35	CFLAR	-1.361	±0.28
36	CRADD	1.267	±0.27
37	DFFA	-2.145	±0.14
38	DIABLO	1.363	±0.33
39	endoG	1.205	±0.14
40	FADD	1.267	±0.25
41	FAM96A	1.370	±0.08
42	FAM96B	-1.744	±0.20
43	FAS	1.032	±0.03
44	FASLG	1.137	±0.12
45	HMGB1	-1.184	±0.10
46	HRK	-1.274	±0.28
47	HSP90B1	2.742	±0.28
48	HTRA2	-1.264	±0.31
49	LRDD	1.085	±0.03
50	MCL1	1.156	±0.07
51	NFKB1	2.502	±0.07
52	NFKB2	-1.128	±0.02
53	NGFR	1.253	±0.17
54	PMAIP1	1.239	±0.19
55	PTEN	1.273	±0.36
56	REL	1.195	±0.31
57	RELA	1.086	±0.07
58	RELB	-1.082	±0.01
59	SOCS2	1.566	±0.12
60	SOCS3	1.349	±0.27
61	STAT1	2.095	±0.08
62	STAT5A	1.429	±0.27
63	STAT5B	1.103	±0.05
64	TNF	1.606	±0.04
65	TNFRSF10A	-1.417	±0.32
66	TNFRSF10B	-1.429	±0.29
67	TNFRSF10C	1.415	±0.35
68	TNFRSF11B	1.062	±0.02
69	TNFRSF1A	-1.226	±0.23

70	TNFRSF1B	1.264	±0.11
71	TNFRSF21	-1.157	±0.15
72	TNFRSF25	-1.073	±0.07
73	TNFSF10	-1.201	±0.22
74	TNFSF11	1.373	±0.29
75	TNFSF8	-1.263	±0.14
76	TP53	1.368	±0.11
77	TP53I3	1.096	±0.04
78	TRAF1	1.341	±0.33
79	TRAF2	1.110	±0.10
80	TRAF3	1.118	±0.05
81	TRAF4	1.371	±0.45
82	TRAF5	1.236	±0.07
83	TRAF6	1.127	±0.08
84	TRAF7	1.211	±0.10



Şekil 4.31. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

Non-KKH'leri

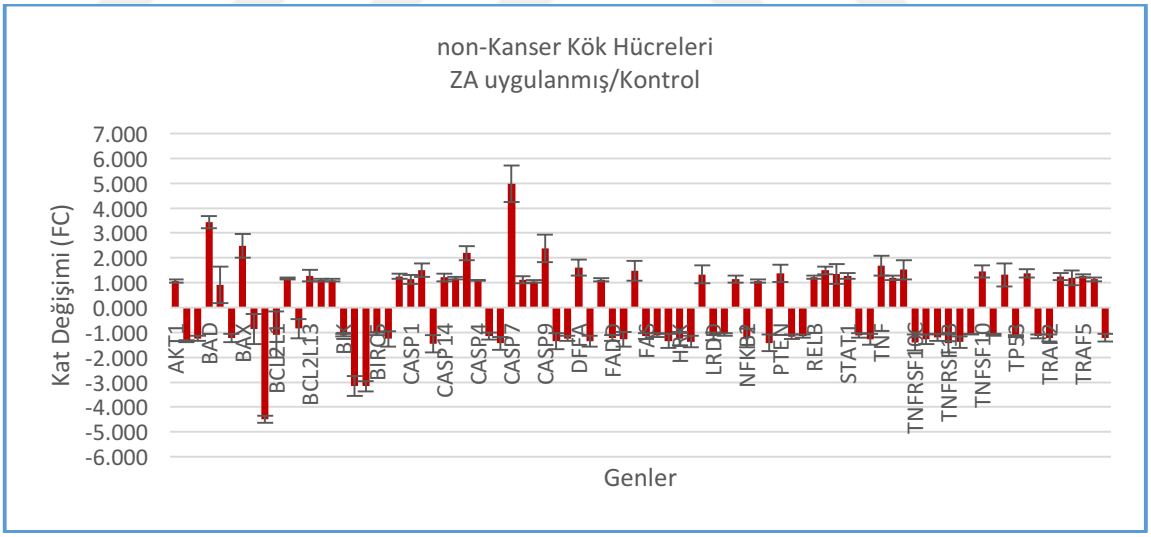
DU-145 non-KKH'leri belirlenen IC_{50} dozunda 72 saat ZA ile inkübe edildikten sonra apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile incelendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 5 gende anlamlı değişim tespit edildi. Buna göre; *CASP7* ve *BAD* genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede arttığı (sırası ile: FC = 4.981 ± 0.74 ve 3.442 ± 0.24, Tablo 4.2 ve Şekil 4.32), *BIRC3*, *BIRC2* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı derecede azaldığı görüldü (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = -3.160 ± 0.20, -3.151 ± 0.40 ve -4.488 ± 0.15, Tablo 4.2 ve Şekil 4.32).

Tablo 4.2. IC_{50} doz ve süresi boyunca DU-145 non-KKH'lerine Zoledronik asid uygulanarak RT-PCR analizi sonucunda apoptozis ile ilişkili genlerinin elde edilen ekspresyon değişiklikleri kat cinsinden ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre gösterilmiştir.

Gen Sembolu		Ortalama ± Standart sapma	
1	AKT1	1.066	±0.06
2	APAF1	-1.353	±0.04
3	AVEN	-1.244	±0.10
4	BAD	3.442	±0.24
5	BAG1	0.911	±0.74
6	BAK1	-1.216	±0.17
7	BAX	2.488	±0.47
8	BBC3	-0.872	±0.61
9	BCL2	-4.488	±0.15
10	BCL2L1	-1.090	±0.92
11	BCL2L10	1.176	±0.04
12	BCL2L11	-0.845	±0.38
13	BCL2L13	1.283	±0.23
14	BCL2L2	1.113	±0.04
15	BID	1.102	±0.06
16	BIK	-1.108	±0.06
17	BIRC2	-3.151	±0.40
18	BIRC3	-3.160	±0.20
19	BIRC5	-1.051	±0.06
20	BOK	-1.258	±0.32
21	CAD	1.254	±0.11
22	CASP1	1.135	±0.18

23	CASP10	1.518	±0.27
24	CASP12	-1.454	±0.36
25	CASP14	1.213	±0.15
26	CASP2	1.180	±0.05
27	CASP3	2.193	±0.28
28	CASP4	1.087	±0.01
29	CASP5	-1.144	±0.15
30	CASP6	-1.434	±0.26
31	CASP7	4.981	±0.74
32	CASP8	1.118	±0.14
33	CASP8AP2	1.050	±0.05
34	CASP9	-1.059	±0.03
35	CFLAR	-1.347	±0.32
36	CRADD	-1.242	±0.10
37	DFFA	1.606	±0.32
38	DIABLO	-1.360	±0.22
39	endoG	1.126	±0.06
40	FADD	-1.221	±0.12
41	FAM96A	-1.280	±0.30
42	FAM96B	1.473	±0.40
43	FAS	-1.151	±0.12
44	FASLG	-1.112	±0.07
45	HMGB1	-1.343	±0.28
46	HRK	-1.250	±0.28
47	HSP90B1	-1.365	±0.23
48	HTRA2	1.336	±0.36
49	LRDD	-1.153	±0.15
50	MCL1	-1.078	±0.06
51	NFKB1	1.141	±0.15
52	NFKB2	-1.226	±0.38
53	NGFR	1.069	±0.05
54	PMAIP1	-1.416	±0.32
55	PTEN	1.372	±0.34
56	REL	-1.171	±0.10
57	RELA	-1.153	±0.06
58	RELB	1.225	±0.07
59	SOCS2	1.495	±0.15
60	SOCS3	1.347	±0.40
61	STAT1	1.274	±0.13
62	STAT5A	-1.115	±0.08
63	STAT5B	-1.277	±0.23
64	TNF	1.682	±0.39
65	TNFRSF10A	1.203	±0.08
66	TNFRSF10B	1.522	±0.38
67	TNFRSF10C	-1.413	±0.32
68	TNFRSF11B	-1.278	±0.19
69	TNFRSF1A	-1.201	±0.14

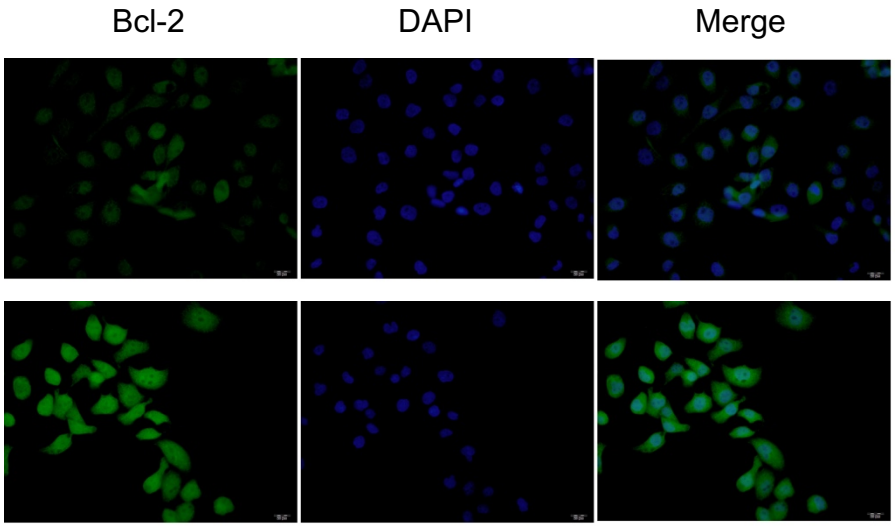
70	TNFRSF1B	-1.438	±0.36
71	TNFRSF21	-1.379	±0.23
72	TNFRSF25	-1.067	±0.01
73	TNFSF10	1.460	±0.24
74	TNFSF11	-1.100	±0.04
75	TNFSF8	1.323	±0.47
76	TP53	-1.136	±0.04
77	TP53I3	1.369	±0.17
78	TRAF1	-1.153	±0.07
79	TRAF2	-1.233	±0.14
80	TRAF3	1.245	±0.14
81	TRAF4	1.194	±0.30
82	TRAF5	1.271	±0.07
83	TRAF6	1.136	±0.09
84	TRAF7	-1.214	±0.15



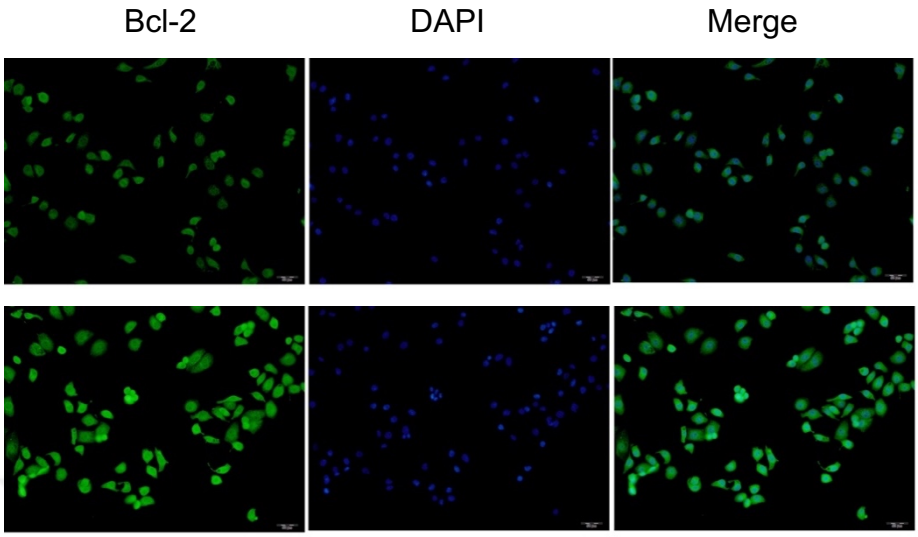
Şekil 4.32. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

4.7. Zoledronik asidin gen ifadesini anlamlı etkilediği apoptotik proteinlerin İmmunofloresans boyama yöntemi ile doğrulaması

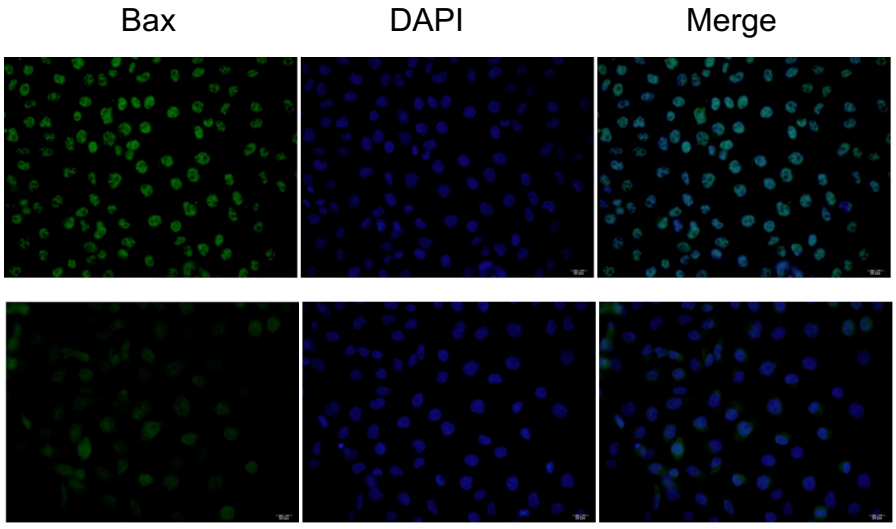
Zoledronik asidin (ZA) IC_{50} dozu ile muamele edilen DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH hücrelerinde, gen ifadeleri anlamlı bulunan apoptotik proteinlerde ortaya çıkan değişimler, immunofloresan boyama yöntemi ile incelendi.
KKH'lerinde, ZA ile muamele edilmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında, Kaspaz-9, Kaspaz-4 ve BAD pro-apoptotik proteinlerinde floresans miktarında artış görülürken, BIRC2, BIRC3 ve Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinde floresans miktarında azalma olduğu gözlendi (Şekil 4.33 - 4.44).
Non-KKH'lerinde, ZA eklenmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında, Kaspaz-3 ve BAX pro-apoptotik proteinlerinin floresan miktarında artış, BIRC2, BIRC3 ve Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerindeki floresansda ise azalma olduğu gözlendi (Şekil 4.33 - 4.44).



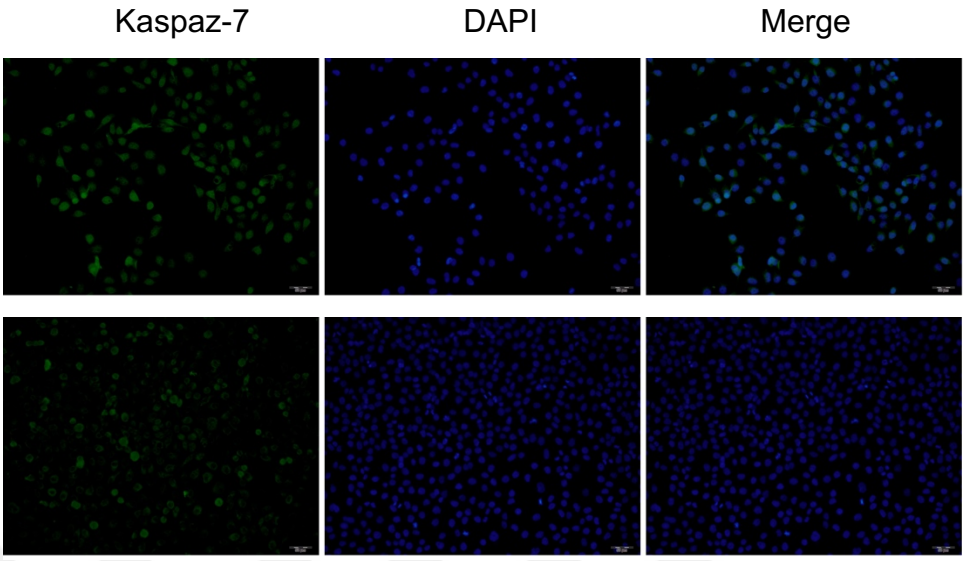
Şekil 4.33. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



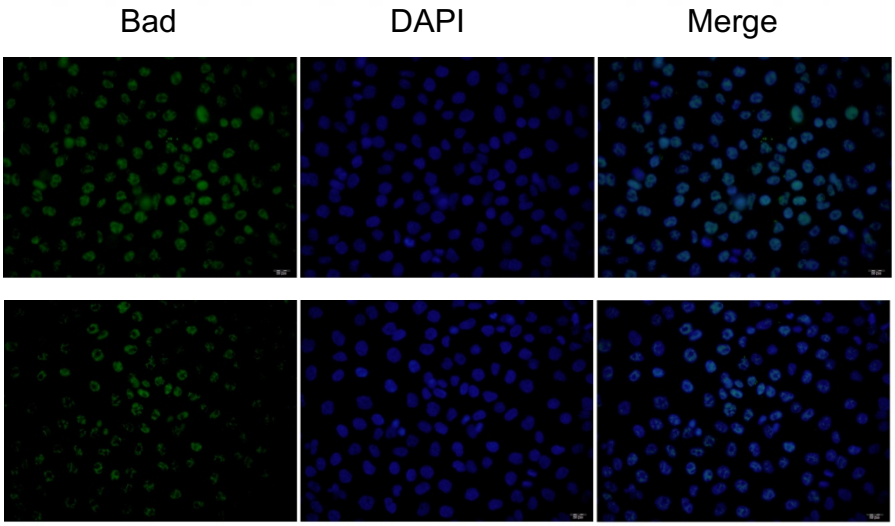
Şekil 4.34. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



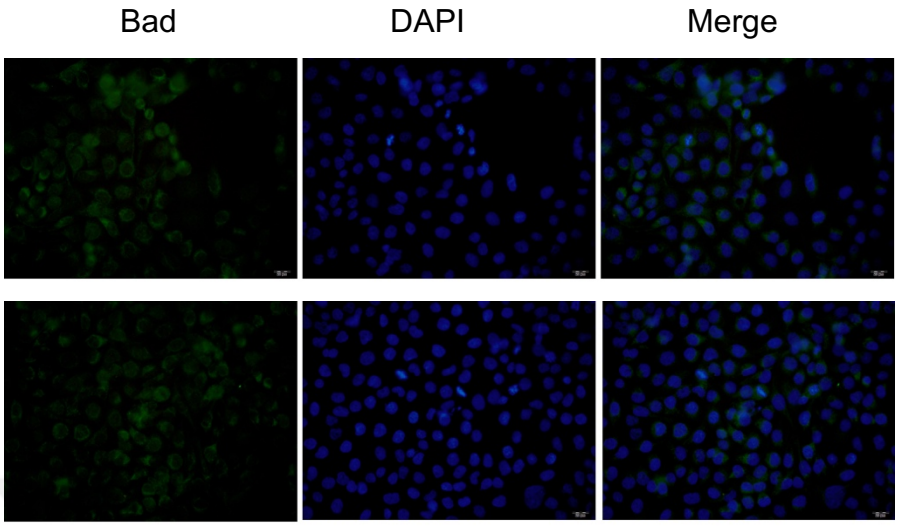
Şekil 4.35. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bax protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



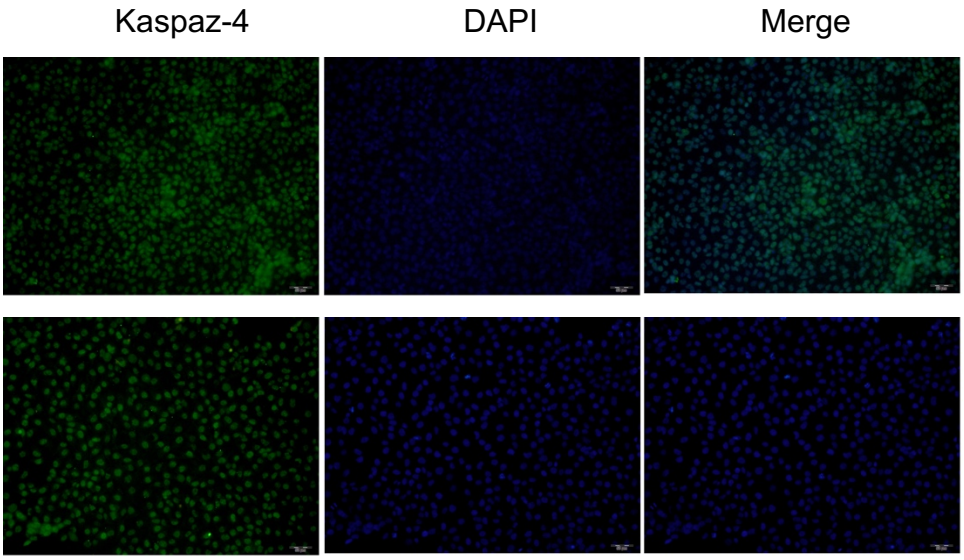
Şekil 4.36. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Kaspaz-7 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



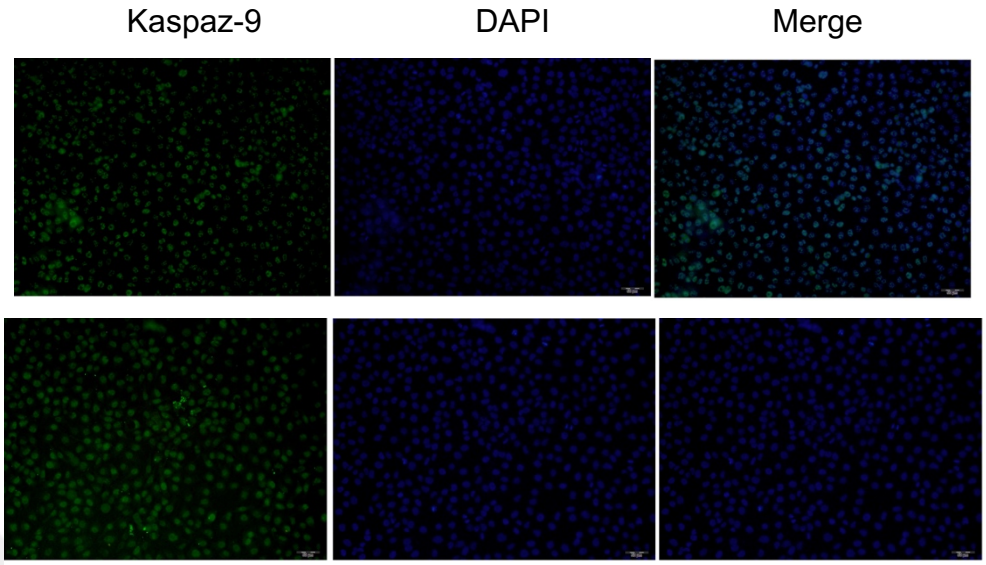
Şekil 4.37. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



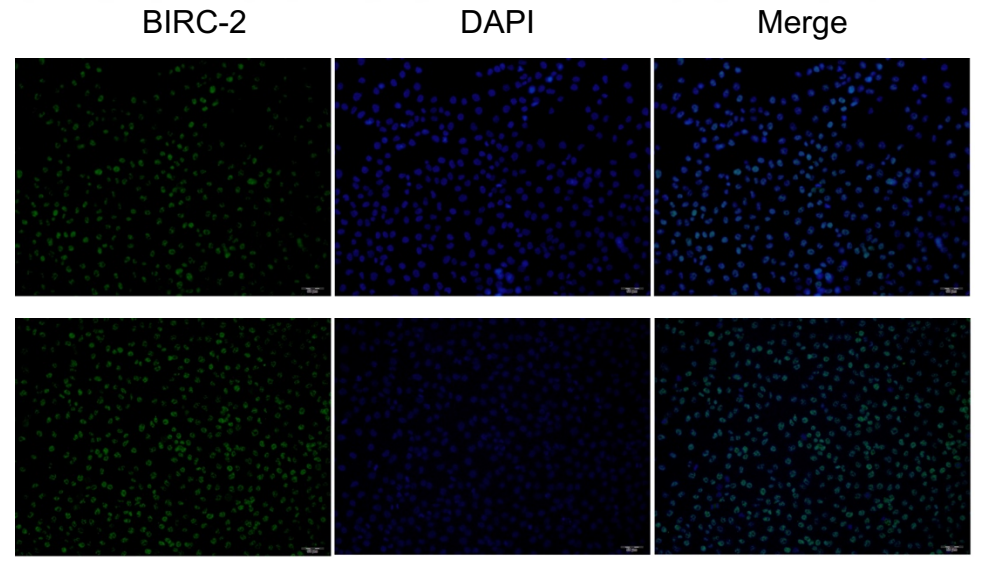
Şekil 4.38. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



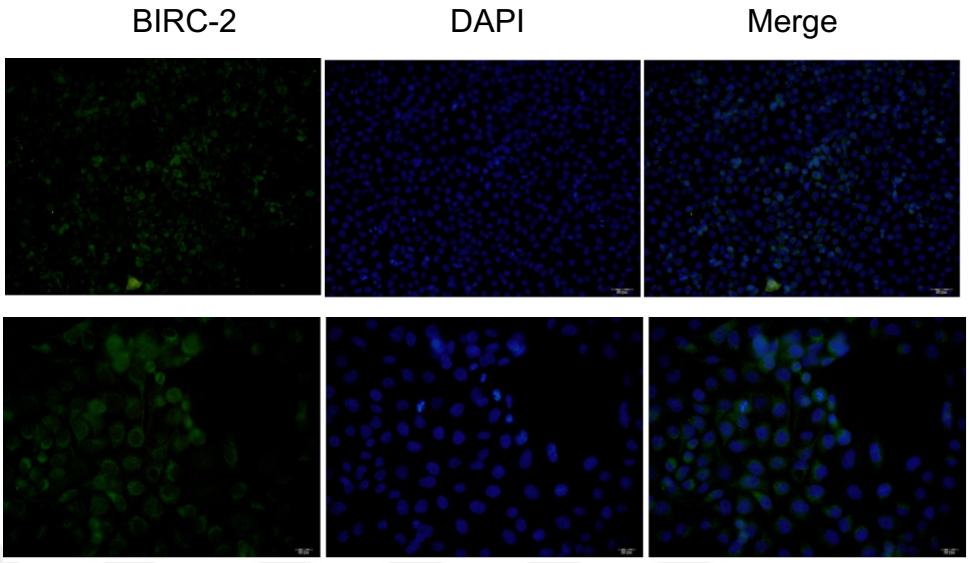
Şekil 4.39. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-4 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



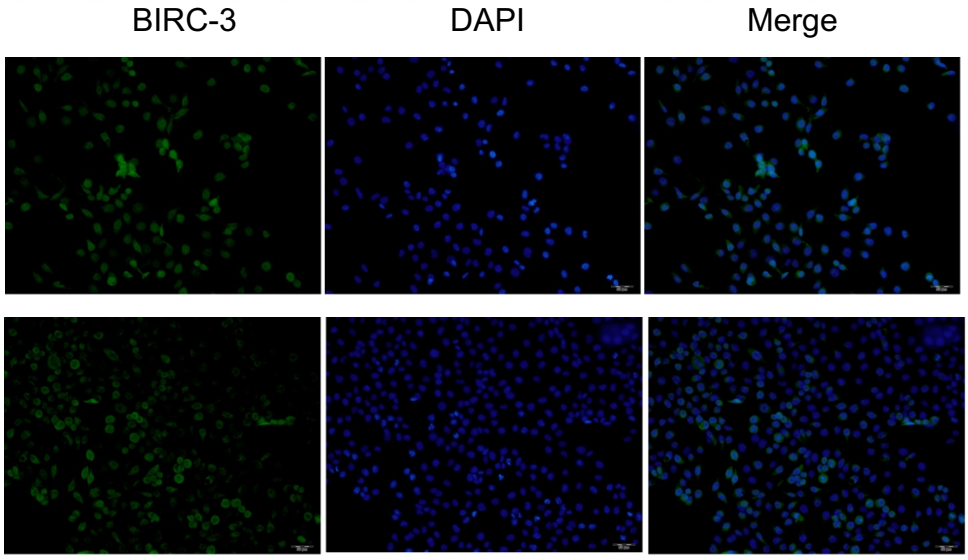
Şekil 4.40. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-9 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



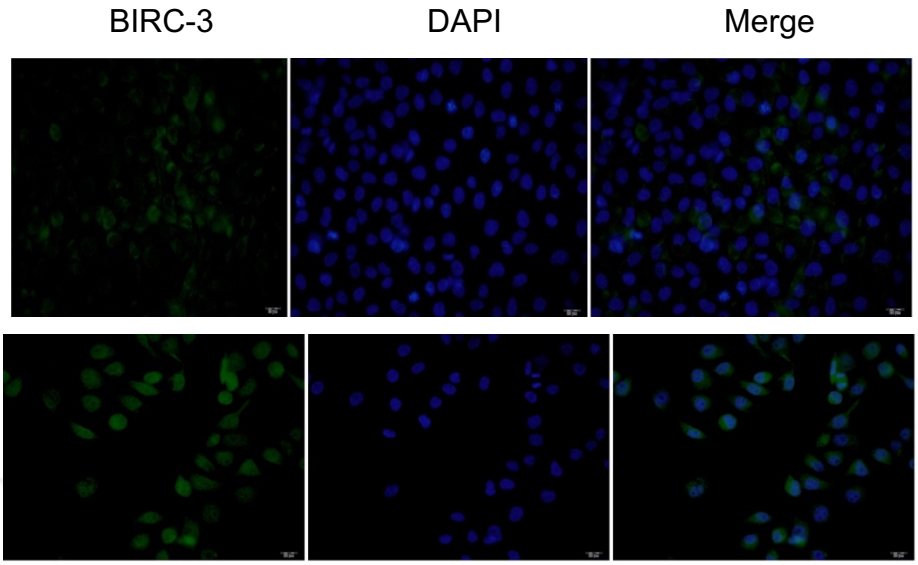
Şekil 4.41. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



Şekil 4.42. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



Şekil 4.43. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



Şekil 4.44. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).

BÖLÜM V

5. TARTIŞMA

Bu çalışmayı bugüne kadar ZA ile yapılmış olan çalışmalardan farklı kılan temel özellik kanser hücre hatlarındaki kök hücreleri ve diğer kanser hücrelerinin ayrı gruplar halinde ele alınarak aynı hücre hattı içinde incelemelerin kanser kök hücresi ve non-kanser kök hücresi için ayrı ayrı yapılıp değerlendirilmiş olmasıdır. O nedenle tartışmada sonuçlarımızı karşılaştırmada kullandığımız kaynaklardaki sonuçlar adı geçen hücre hattındaki tüm kanser hücrelerine ait olup kanser kök hücresi ya da non-KKH ayrımı söz konusu değildir.

Çalışmamızda hem meme ve hem prostat kanserlerinde ZA'in doğrudan kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini saptadık. Bu bulgular daha önce yayınlanmış pek çok pre-klinik çalışmanın sonucu ile tutarlıdır. Örnek verecek olusak; Han ve arkadaşları, ZA'in SW480 insan kolon kanseri hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkilerini ve mekanizmasını inceledikleri bir çalışmada ZA'in konsantrasyon ve zamanla artan biçimde bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücreleri apoptoza götürdüğünü ve bunu mitokondri permeabilitesini arttırıp sitokrom C'nin sitozole salınmasını arttırarak gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır (161). ZA'in insan fibrosarkoma hücrelerindeki anti kanser etkileri üzerinde çalışan bir grup ise ZA'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini farklı dozlarda (0-10 μM) ve diğer antitümör ajanlarla birlikte vererek incelemişler ve ZA'in insan fibrosarkoma hücre hattında proliferasyonu doğrudan inhibe ettiğini ve diğer antitümör ajanlarla birlikte verildiğinde bunların tedavi etkinliğini arttırabileceğini bildirmişlerdir (162). Aynı grup deneysel bir hayvan modelinde de ZA ile çalışmış ve klinik dozlardaki ZA'in farelerde osteosarkomanın spontan akciğer metastazını inhibe ettiğini görmüşlerdir (98). Akciğer kanserinde hem *in vitr*o (insan akciğer kanser hücre hatları) hem de *in vivo* (akciğer kanseri xenograft fare modeli) ortamda ZA'in prenilasyonu inhibe ederek Ras ailesi onkoproteinlerin aberran aktivasyonunu engellediği, bu yolla anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği ve akciğer kanserinin tedavisinde diğer kemoterapötiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik etki ile tedaviye karşı oluşan direncin üstesinden gelinmesine yardımcı olduğu ortaya konmuştur (163). ZA

özellikle metastatik/tümörijenik potansiyeli yüksek olan prostat ve meme kanser hücre hatlarında kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamakta ve apoptozu survivin ve kaspaz-3 ve -7'de down regülasyon yolu ile indüklemektedir (104). Bu literatürlerin ışığında kendi sonuçlarımızı incelersek; üzerinde çalıştığımız 4 farklı hücre grubuna ait IC_{50} değerlerine baktığımızda öncelikle meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ZA'e olan duyarlılıklarının prostat kanseri DU-145 hücrelerinden daha yüksek olduğunu saptadık. Diğer önemli bir gözlemimiz ise ZA'in sitotoksik etkisinin DU-145 hücrelerinde non-KKH'leri üzerinde daha belirgin olduğu idi. Bu bulgular prostat KKH'lerinin ZA'e karşı non-KKH'lerine göre daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. ZA meme MCF-7 hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etki göstermiş olmakla birlikte sitotoksisite açısından KKH ve non-KKH'leri arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu bulgular, sağ kalım kapasitesi ve ilaç direnci yeteneğinin farklı türden KKH'lerinde değişiklik gösterebileceğini ortaya koymuştur. Prostat KKH'lerinin ZA'in anti-proliferatif etkilerine karşı non-KKH'lerinden daha dirençli olması anlamlı ve KKH'lerinin malignite potansiyelini destekleyen bir bulgu olarak açıklanabilir.

Bu çalışmada yanıtını aradığımız önemli bir soru ZA'in sitotoksik etkisinin apoptoz yolu ile olup olmadığıdır. ZA'in kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olduğunu gösteren bir çok yayın bulunmaktadır. İnsan meme MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında ZA'in apoptotik etkilerinin incelendiği bir araştırmanın sonuçlarında ZA'in bu hücreler üzerinde apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (164). Avci ve arkadaşları bu yıl içinde yayınladıkları çalışmada U87MG glioblastoma multiforme hücrelerinde ZA'in ERN1, TLR2 ve IRF5 genlerinin ifadesini indüklemek yolu ile apoptotik etki gösterdiğini bildirmektedirler (165). Yaptığımız AnnexinV testlerinin sonuçları ZA'in hem meme kanseri ve hem prostat kanseri hücreleri üzerinde anlamlı apoptotik etkisi olduğunu gösterdi. Sonuçlarımız, ZA'in meme kanseri hücrelerinde prostat hücrelerine göre daha belirgin apoptotik etki oluşturduğunu, ancak bu etkinin meme KKH'leri ve non-KKH'leri arasında anlamlı bir fark göstermediğini ortaya koydu. Prostat hücrelerine baktığımızda, ZA KKH'lerinde non-KKH'lerine göre

daha anlamlı bir apoptotik etki gösterdi. Bu bulgular, ZA'in apoptotik etkisinin faklı tür KKH'lerinde değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada meme kanseri MCF-7 KKH'leri ve non-KKH'leri arasında viabilite ve apoptoz sonuçlarında anlamlı farklılık gözlenmediği için sadece prostat DU-145 KKH'leri ve non-KKH'leri için gen ekspresyon analizi yapıldı. Ardından, ifade seviyesindeki değişimler anlamlı bulunan genlerde protein düzeyleri immünofloresans yöntemi ile kalitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonuçları ekspresyon seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerle uyumlu bulundu.

Kaspazlar apoptozu geri dönüşümsüz biçimde indükleyen önemli bir protein ailesidir. Mezotelyoma MSTO-211H hücre hattında ZA'in apoptotik etki mekanizmasının small interfering RNA (siRNA) ile gen susturma yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada mezotelyoma hücrelerinde kaspaz 3, 7, 8, 9 ve poliADP-riboz polimeraz (PARP) proteinlerinde aktifleşme tespit edilmiştir (166). Diğer bir çalışmada Ullen ve arkadaşları ZA'in üç farklı renal kanser hücre hattı üzerinde etkilerini araştırmışlar, ZA'in bu hücrelerde kaspaza bağımlı apoptotik etkisini ortaya koymuşlardır (101). Yine diğer bir güncel çalışmada Varol ve arkadaşları PC3 prostat kanseri hücre hatlarında ve onların docetaxele dirençli türlerinde ZA'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemişler ve ZA'in dozunun arttığı oranda prostat kanseri hücrelerinde DNA fragmantasyonu ve kaspaz-3 ile -7'nin aktifleştiğini tespit etmişlerdir (167). ZA'in, özellikle tümörijenik potansiyeli yüksek hücrelerde (PC3, MCF 7) tümörijenik etkisi düşük ya da bulunmayan hücre hatlarına (LNCaP, MCF 10a) kıyasla daha etkin bir biçimde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve survivin, kaspaz 3 ve 7-üzerinden apoptozu indüklediği bildirilmektedir (104). Bizim çalışmamızda da ZA'in prostat KKH'lerinde kaspaz-9 ve-4 ve non-KKH'lerinde kaspaz-7'nin hem gen ifadesini hem de protein düzeyini arttırdığını saptamış olmamız yukarıdaki araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir.

Bcl-2 ailesi proteinleri intrensek mitokondrial apoptotik yolak ve tümör nekroz faktör ile tetiklenen ekstrensek apoptotik yolak üzerinden düzenleyebildiklerinden apoptotik yanıt açısından önemlidirler (168). ZA'in bu

protein ailesinde anlamlı değişiklikler oluşturduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, Wang ve arkadaşları ZA'in apoptotik etkilerini HeLa, SiHa ve CaSki olmak üzere üç farklı insan serviks kanseri hücre hattında incelediklerinde Bcl-2 ve BAX moleküllerinin seviyelerinde değişiklik tespit etmiş ve bu durumun ZA'in apoptotik etkisi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (169). Ottewell ve arkadaşları fare modeli kullanarak *in vivo* ortamda klinik dozlarda önce doksorubisin ve ardından ZA verildiğinde erken evre meme tümörlerinin büyümesi üzerine olan etkileri incelemişlerdir. Önce doksorubisin ardından ZA verildiğinde subkutan meme tümörünün büyümesi ve kemik metastazı engellenmiş, ilaçların iki ayrı tedavi şeklinde uygulanması kombine tedaviye göre daha etkili bulunmuştur. Tümörler incelendiğinde yüksek düzeyde apoptoz göstermişler, gen analizlerinde BCLXL proteininde artış ve kaspaz-3,-8,ve -9'da aktifleşme tespit edilmiştir (170). Uzun süreli ZA tedavisi ZA direncine neden olabilir ve bu durumda kanser hücrelerinin apoptotik aktivitesi de azalır. Bu bağlamda Aoyagi ve arkadaşları A549 ve H1650 küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin ZA'e direncinin mekanizmasını araştırmışlardır. Araştırmacılar bu hücreleri devamlı olarak ZA ile muamele ederek dirençli bir popülasyon elde etmişler ve bu hücrelerde BCL-2 ailesi genlerinin ifadesini inceleme altına almışlardır. ZA'e direnç gösteren hücrelerde BCL-2 ailesi genleri içinde sadece BAX geninde anlamlı bir ifade azalması tespit etmişlerdir. Bu durum ZA direncinden BAX genindeki down-regülasyonun kısmen sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (171). Bizim çalışmamızda, BCL-2 ailesi proteinlerden BCL-2 proteini hem prostat KKH hem de non-KKH'lerinde anlamlı down-regüle bulunmuştur. Bu aileden Bad proteininin ise gen ifadesi ve hücrede bulunan protein seviyesi hem KKH ve non-KKH'lerinde anlamlı düzeyde yüksek bulundu. BAX geni ise sadece KKH'lerinde anlamlı yüksek bulundu.

Mitokondri aracılı apoptotik süreç mitokondriyal permeabilite değişikliği ile başlar, ardından sitokrom C ve apoptoz indükleyici factor gibi apoptojenik faktörlerin salınımı gerçekleşir (172,173). sitozolde sitokrom c/Apaf-1/prokaspaz-9 apoptozom kompleksi apoptozu başlatan kaspaz-9'u aktive eder, bu da yolağın devamındaki diğer efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar.(174). Bcl-2 ailesi

proteinleri, voltaj-bağımlı anyon kanalı gibi mitokondriyal kanallarla etkileşerek mitokondriyal permeabiliteyi düzenlerler (175,176). Bu ailenin BAX ve Bid gibi pro-apoptotik etkili üyeleri apoptotik faktörlerin salınımını uyarır. Bizim çalışmamızda ZA uygulaması prostat KKH'lerinde antiapoptotik etkili Bcl-2 ekspresyonunu azaltıp kaspaz-9, 4, BAX ve Bad gibi pro-apoptotik etkili proteinlerin miktarlarında artışa neden oldu. Bu bulgular, prostat KKH'lerinde ZA ile indüklenen apoptozun mitokondri-bağımlı intrensek yoldan kaspaz-9 ve Bcl-2 ailesi proteinlerin modülasyonu ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Apoptozda önemli role sahip diğer bir protein, apoptotik proteinlerin inhibitörüdür (IAP). İlk olarak Baculovirus'ta, ardından Drosophila ve memelilerde de tanımlanan anti-apoptotik etkili bir protein ailesidir (177). Bu proteinlerin kaspaz aktivitesinin düzenlemesi, hücre bölünmesi ve sağ kalım yolaklarının düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar bu proteinlerden tanımlananlar NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein; BIRC1), cIAP1 ve cIAP2 (sırayla cellular inhibitor of apoptosis 1 ve 2; BIRC2 ve BIRC3), XIAP (X-chromosome binding IAP; BIRC4), survivin (BIRC5), BRUCE (Apollon; BIRC6), livin (BIRC7) ve Ts-IAP (testis-specific IAP; BIRC8) 'dir (178). IAP proteinlerin onkogenezde ve antitümöral tedavideki dirençte katkısı olduğu gösterilmiştir. IAP proteinlerin overekspresyonu lösemi, B hücreli lenfoma gibi çeşitli kanserlerde tespit edilmiştir. Ayrıca Deveruax ve ark., IAP1 ve IAP2 proteinlerinin kaspaz-9 ve ardından kaspas-3 ve -7 proteinini inhibe ettiğini göstermişlerdir (24) Bu projede incelediğimiz IAP ailesi proteinleri arasında, BIRC2 (IAP1) ve BIRC3 (IAP2) proteinlerinin anlamlı şekilde down regüle olduğunu saptadık. Hem KKH'leri hem de non-KKH'lerinde ZA ile muamele BIRC2 ve BIRC3 proteinlerinde down-regülasyona neden oldu. Bizim bulgularımızda da, hücreler ZA ile muamele edildiğinde IAP1 ve IAP2 proteinlerin azalması ve kaspaz-3, -4 ve -9'ta yükselme literatirdeki çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Azotlu bifosfonatların izoprenoid sentezini inhibe ettikleri bilinmektedir (179). Bu bileşikler izoprenoid difosfat lipidlerin analoğu gibi davranarak farnezil pirofosfat sentazı inhibe ederler, bunun sonucunda Ras, Rac ve Rho ailesi gibi küçük G proteinlerin translasyon sonrası farnezilasyonu inhibe olur (180). Bu

bilgilerin ışığında, bifosfonatların indüklediği apoptozun mekanizması olarak mevalonat yolağının inhibisyonu üzerinde önemle durulmaktadır (181–184). Gobel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, MDA-MB-231, MDA-Bone ve MDA-Met gibi çeşitli meme kanseri hücre hatlarında statin ve ZA ile mevalonat yolağı inhibe edildiğinde kaspaz-3 ve -7'de aktifleşme ve apoptoz düzeyinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (185). Bizim çalışmamızda da prostat KKH'lerinde kaspaz-7 ve -4'de aktifleşme ile ortaya konduğu gibi apoptozun non-KKH'lerine göre anlamlı bir şekilde indüklendiği gözlendi. KKH'lerinde saptadığımız bu apoptotik indüksiyonun nedeni mevalonat yolağının ZA tarafından inhibisyonu olabilir. Bu savı destekleyecek daha ayrıntılı çalışmaların mekanizmaların aydınlatılmasında yararlı olacağı kanaatindeyiz.

Bu projede hücre döngüsünün aşamalarına baktığımızda ZA ile muamele edilen prostat KKH'lerinde G0/G1 fazında kayıp, S ve G2/M fazlarında birikme şeklinde özetlenebilecek anlamlı bir değişim saptadık. Bu bulgular, ZA'in hücre döngüsüne müdahale yoluyla da ilave bir sitostatik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Farklı tümör türleri ile daha önce yapılmış çalışmaların bulgularına baktığımızda da ZA ile muamele edilen tümör hücrelerinin S fazında birikim gösterdiğini gördük. Bu açıdan bulgularımız literatürdeki diğer çalışmaların bulguları ile uyumludur (186–189).

BÖÜM VI

6. Sonuç ve Öneriler

Kanser kök hücreleri kendi kendini yenileyebilme ve farklı tümör alt tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip küçük bir hücre popülasyonu olarak, tümör yığınını oluşturan diğer daha düşük tümör oluşturma potansiyeline sahip hücrelerden (non-Kanser kök hücre) ayrılmaktadırlar. Tümörün tekrarlamasından, uzak metastazdan, anjiyogenezden ve ilaç direncinden kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kanserlerin çoğunda, radyoterapi iyi bir noninvaziv tedavi seçeneği ve yüksek sağkalım oranları sunarken, kanser kök hücreleri üzerine etkili olmadıkları için tedavinin etkinliği de düşük olabilmektedir. Her ne kadar kanser kök hücreleri tümör kitlesinin çok küçük bir oranını oluştursa da tedaviye direncin ortaya çıkmasında başrolü oynarlar. Bu nedenle kanser tedavisi için temel olarak kanser kök hücrelerini ortadan kaldıracak daha etkili ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, ZA'in özellikle DU145 $CD133^{+}/CD44^{+}$ KKH'lerinde doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkiye neden olduğunu göstermektedir. ZA'in insan prostat kanseri DU-145 KKH ve non-KKH'leri, ve meme kanseri MCF-7 KKH ve non-KKH'leri üzerindeki apoptotik etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. Bu çalışma ZA'in KKH'leri üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.
2. ZA'in insan prostat kanseri DU-145 ve meme kanseri MCF-7 hücrelerinden izole edilen KKH ve non-KKH'lerinde hem doza bağımlı (0 - 140 µM) ve hem zamana bağımlı (24, 48 ve 72 saat) olarak sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur
3. ZA'in IC_{50} değeri 72. saatte DU-145 KKH'leri için 108 µM, non-KKH'lerinde ise 96 µM olarak hesaplandı. MCF-7 KKH'leri ve non-KKH'lerinde IC_{50} değeri i 72. saatte sırası ile 94 µM ve 92 µM idi
4. ZA'in prostat kanseri DU-145 KKH'leri üzerindeki sitotoksik etkisinin non-KKH'lerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi. MCF-7

meme kanser hücre hattında ise sitotoksik etki açısından KKH'leri ve non-KKH'leri arasında anlamlı fark bulunmadı.

5. IC_{50} dozunda ZA ile muamele edilen her 4 deney grubunda apoptozun indüklendiği saptandı.
6. ZA'in prostat kanseri DU-145 KKH'leri üzerindeki apoptotik etkisinin non-KKH'lerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi. MCF-7 meme kanser hücre hattında ise apoptotik etki açısından KKH'leri ve non-KKH'leri arasında anlamlı fark bulunmadı.
7. IC_{50} dozunda ZA ile 72 saat muamele edilen prostat kanseri DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinde oluşan değişimler incelendiğinde pro-apoptotik kaspaz-9 ve -4, BAD ve BAX genlerinin ifadesinde artış gözlenirken anti-apoptotik BCL-2, BIRC2 ve BIRC3 genlerinin ifadesinde azalışın olduğu görüldü.
8. Aynı doz ve süre ile ZA uygulanan prostat kanseri DU-145 non-KKH'lerinde ise pro-apoptotik olan *kaspaz-7* ve *BAD* genlerin ifadesinde artış, anti-apoptotik *BCL-2, BIRC2* ve *BIRC3* genlerinin ifadesinde azalış saptandı.
9. İfade seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerde protein düzeyleri immünofloresans yöntemi ile kalitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonuçları ifade seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerle uyumlu idi.
10. ZA'in her 4 hücre grubunda spesifik olarak hücre döngüsünün S fazında duraklamaya neden olduğu belirlendi.
11. Bu çalışmanın verileri ZA'in MCF-7 meme kanser KKH'lerinde diğer hücrelere göre daha etkili olmadığını, ancak prostat DU-145 $CD133^{+}/CD44^{+}$ KKH'lerinde non-KKH'lerine göre anlamlı düzeyde sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle antikanser bir ajan olarak ZA uygulaması özellikle KKH'lerini hedef alma potansiyeli taşıdığından KKH'lerine bağlı direncin gelişimini de azaltabilir.

Hücre kültürü çalışması ile ortaya koyduğumuz ZA'in prostat KKH'leri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin deneysel hayvan modelleri ile de desteklenmesi ve olumlu sonuçlar alındığı takdirde klinikte özellikle meme kanserinin adjuvan kemoterapisinde kullanılan bu ajanın prostat başta olmak üzere diğer kanser türlerinde de kullanılarak KKH'lerine bağlı olarak gelişen kanser nüksü ve ilaç direnci gibi olumsuz klinik durumların üstesinden gelinmesine katkı yapacağı kanaatindeyiz.

BÖLÜM VII

7. KAYNAKLAR

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature [Internet]. 2001;414(6859):105–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689955
2. Hong I, Lee H, Nam J. Cancer Stem Cells : The “ Achilles Heel ” of Chemo-Resistant Tumors. 2015;2–22.
3. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;22(3):457–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357481
4. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? Cell Cycle [Internet]. 2007;6(19):2332–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786053\nhttps://www.landesbioscience.com/journals/cc/CampbellCC6-19.pdf
5. Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. Acta Pharmacol Sin [Internet]. 2013;34(6):732–40. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3674516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
6. BRUCE WR, VAN DER GAAG H. A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. Nature [Internet]. 1963;199:79–80. Available from: http://www.nature.com/nature/journal/v199/n4888/abs/199079a0.html\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14047954
7. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. Breast Cancer Res [Internet]. 2008;10(2):R25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366788
8. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad

Sci U S A [Internet]. 2003;100(7):3983–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629218

9. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature [Internet]. 2006;444(7120):756–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051156\nhttp://www.nature.com/nature/journal/v444/n7120/pdf/nature05236.pdf
10. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Mol Cancer Res [Internet]. 2009;7(3):330–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4255559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
11. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009;106(38):16281–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805294
12. Lee TKW, Castilho A, Cheung VCH, Tang KH, Ma S, Ng IOL. CD24 + Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation. Cell Stem Cell. 2011;9(1):50–63.
13. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, Spencer-Dene B, Hossaini S, Abuzinadah M, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. Stem Cells. 2012;30(10):2076–87.
14. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2007;104(3):973–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210912
15. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. Identification of

a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. FASEB J [Internet]. 2008;22(10):3696–705. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614581

16. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer. Cell [Internet]. 2000;100(1):57–70. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674(00)81683-9\nhttp://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195FC1-5/2/aef1d48431eadea4567b697b1fee0514
17. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res [Internet]. 2003;63(18):5821–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905
18. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature [Internet]. 2007;445(7123):111–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122771
19. Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, et al. Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. Cancer Res. 2008;68(12):4674–82.
20. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev [Internet]. 2003;17(10):1253–70. Available from: http://genesdev.cshlp.org/content/17/10/1253.full
21. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2007;104(2):618–23. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1766434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
22. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature. 2009;458(7239):780–3.

23. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 2008;100(9):672–9.
24. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 2004;64(19):7011–21.
25. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003;100(25):15178–83. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature [Internet]. 1994;367(6464):645–8. Available from: http://www.nature.com.ez.srv.meduniwien.ac.at/nature/journal/v367/n6464/abs/367645a0.html
27. O'Brien C a, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature. 2007;445(7123):106–10.
28. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clin Cancer Res [Internet]. 2008;14(5):1310–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316549
29. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat Biotechnol. 2007;25(11):1315–21.
30. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. Cancer Res. 2005;65(10):4320–33.
31. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and

Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. Cell Stem Cell. 2007;1(3):313–23.

32. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. Mol Cancer [Internet]. 2011;10(1):128. Available from: http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/128
33. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. PLoS One. 2008;3(6).
34. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24-/low/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. J Natl Cancer Inst. 2006;98(24):1777–85.
35. LaBarge MA. The difficulty of targeting cancer stem cell niches. Clin Cancer Res [Internet]. 2010;16(12):3121–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530700
36. Lacerda L, Pusztai L, Woodward WA. The role of tumor initiating cells in drug resistance of breast cancer: Implications for future therapeutic approaches. Drug Resist Updat. 2010;13(4–5):99–108.
37. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. Drug Resist Updat [Internet]. 2010;13(4–5):109–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692200
38. Dou J, Gu N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. Tumor Biol. 2010;31(4):243–53.
39. Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. FEBS Letters. 2010. p. 1659–64.
40. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TKW, Wo JYH, Ng IOL, et al. Identification and

Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells. Gastroenterology. 2007;132(7):2542–56.

41. Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, et al. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. J Pathol [Internet]. 2009;219(4):427–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621338
42. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. Cancer Lett. 2010;289(2):151–60.
43. Naor D, Sionov R V, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. Adv Cancer Res. 1997;71:241–319.
44. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. Cancer Res [Internet]. 2008;68(11):4311–20. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/11/4311.short\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2553722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
45. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, et al. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. Oncol Rep. 2009;22(5):1129–34.
46. Yang YM, Chang JW. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. Cancer Invest [Internet]. 2008;26(7):725–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18608209\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18608209

47. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. Stem Cells [Internet]. 2009;27(5):1006–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415765
48. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, et al. CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. Annals of surgical oncology. 2008. p. 2927–33.
49. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. J Clin Oncol [Internet]. 2008;26(17):2806–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539958
50. Dubrovska A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009;106(1):268–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19116269
51. Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. PLoS One [Internet]. 2010;5(11):e14062. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124918
52. Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung S-W, Lee C-T, Chung J-H. CD24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-small Cell Lung Carcinomas: A Retrospective Study of Prognostic Factor Analysis from the Viewpoint of Forthcoming (Seventh) New TNM Classification. J Thorac Oncol [Internet]. Elsevier; 2016 Aug 14;5(5):649–57. Available from: http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d5e554
53. Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. Clin Cancer Res. 2003;9:4906–13.
54. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature [Internet]. 2005;434(7035):843–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829953

55. Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, et al. Loss of ??-Catenin Impairs the Renewal of Normal and CML Stem Cells In Vivo. Cancer Cell. 2007;12(6):528–41.
56. Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Biol. 2009;17(1):9–26.
57. Yin L, Velazquez OC, Liu Z-J. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. Biochem Pharmacol [Internet]. 2010;80(5):690–701. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.03.026
58. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980;287(5785):795–801.
59. Lee JJ, Von Kessler DP, Parks S, Beachy P a. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. Cell. 1992;71(1):33–50.
60. Mohler J, Vani K. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of Drosophila. Development [Internet]. 1992;115(4):957–71. Available from: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1280560&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers2://publication/uuid/3AD35552-AC40-4C5F-978E-ED48D4D1BB8C\npapers2://publication/uuid/18411D27-2513-4815-8405-DAE8B3B15738
61. Tabata T, Eaton S, Kornberg TB. The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells ana is a target of engrailed regulation. Genes Dev. 1992;6(12 PART B):2635–45.
62. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. Expert Opin Drug Metab Toxicol [Internet]. 2008;4(6):697–720. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.4.6.697?journalCode=iemt20
63. Black W, Vasiliou V. The aldehyde dehydrogenase gene superfamily resource center. Hum Genomics [Internet]. 2009;4(2):136–42. Available

from:
http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3525204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

64. Cheung a MS, Wan TSK, Leung JCK, Chan LYY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK. 2007;21(7):1423–30.
65. Ginestier C, Hur M, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell. 2007;1:555–67.
66. Prasmickaite L, Enges??ter B, Skrbo N, Hellenes T, Kristian A, Oliver NK, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity does not select for cells with enhanced aggressive properties in malignant melanoma. PLoS One. 2010;5(5).
67. Rasper M, Sch??fer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. Neuro Oncol. 2010;12(10):1024–33.
68. Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. Mol Cancer Res [Internet]. 2008;6(7):1146–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644979
69. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. Head Neck [Internet]. 2010;32(9):1195–201. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20073073
70. Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Tong Z, Steindler DA, Scott EW, et al. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. Cancer Res. 2009;69(20):8208–15.

71. Van Den Hoogen C, Van Der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Lippitt JM, Guzmán-Ramírez N, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. Cancer Res. 2010;70(12):5163–73.
72. Lagas JS, Vlaming MLHH, Schinkel AH. Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters: the power of combination knockout mice. Mol Interv [Internet]. 2009;9(3):136–45. Available from: http://molinterv.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mi.9.3.7\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592674
73. Ejendal KFK, Hrycyna C a. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. Curr Protein Pept Sci. 2002;3(5):503–11.
74. Gangavarapu KJ, Azabdaftari G, Morrison CD, Miller A, Foster B a, Huss WJ. Aldehyde dehydrogenase and ATP binding cassette transporter G2 (ABCG2) functional assays isolate different populations of prostate stem cells where ABCG2 function selects for cells with increased stem cell activity. Stem Cell Res Ther [Internet]. 2013;4(5):132. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3854760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
75. Li W-Q, Li Y-M, Tao B-B, Lu Y-C, Hu G-H, Liu H-M, et al. Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. Med Sci Monit. 2010;16(10):HY27-Y30.
76. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li D-QQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. Stem Cells [Internet]. 2005;23(1):63–73. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2004-0110/full
77. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. Hepatobiliary Pancreat Dis Int [Internet]. 2007;6(1):92–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287174
78. Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel PA, Meister M, et al. The

cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2011;31(12):4491–500.

79. Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, et al. Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. Int J Cancer. 2010;126(4):841–51.
80. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. Bone. 2011;49(1):2–19.
81. Von Baeyer H HK. Acetodiphosphorige Saure. Berichte Dtsch Chem Ges. 1897;20:1973–1978.
82. Fleisch H. Development of bisphosphonates. Breast Cancer Res [Internet]. 2002;4(1):30–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879557
83. Francis MD, Russell RGG, Fleisch H. Diphosphonates Inhibit Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and Pathological Calcification in vivo. Science (80-). 1969;165(3899):1264–6.
84. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone. 2011. p. 34–41.
85. Rogers MJ, Brown RJ, Hodkin V, Blackburn GM, Russell RG, Watts DJ. Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1996;224(3):863–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713136
86. Pelorgeas S, Martin JB, Satre M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould Dictyostelium discoideum. A 31P NMR study. Biochem Pharmacol. 1992;44(11):2157–63.
87. Auriola S, Frith J, Rogers MJ, Koivuniemi A, Mönkkönen J. Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 1997;704(1–2):187–95.
88. Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate

and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. J Bone Miner Res. 1997;12(9):1358–67.

89. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo K V, Mönkkönen J, Rogers MJ, et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. Mol Pharmacol. 2002;61(5):1255–62.
90. Amin D, Cornell SA, Perrone MH, Bilder GE. 1-hydroxy-3-(methylpentylamino)-propylidene-1,1-bisphosphonic acid as a potent inhibitor of squalene synthase. Arzneimittel-Forschung/Drug Res [Internet]. 1996;46(8):759–62. Available from: <Go to ISI>://A1996VE92500005
91. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. Annu Rev Biochem [Internet]. 1996;65:241–69. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811180
92. Konstantinopoulos PA, Karamouzis M V, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2007;6(7):541–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17585331
93. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell. 1992;70(3):389–99.
94. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell. 1992;70(3):401–10.
95. Zerial M, Stenmark H. Rab GTPases in vesicular transport. Curr Opin Cell Biol [Internet]. 1993;5(4):613–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257602
96. Zekri J, Mansour M, Karim SM. The anti-tumour effects of zoledronic acid.

J Bone Oncol [Internet]. Elsevier; 2014 Mar;3(1):25–35. Available from: http://www.journalofboneoncology.org/article/S2212-1374(13)00070-5/abstract

97. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. Oncol Rep [Internet]. 2010;24(1):233–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514467
98. Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, et al. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. Cancer Lett. 2009;274(2):271–8.
99. Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, et al. Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. J Bone Joint Surg Am. 2010;92(1):162–8.
100. Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoke K, Ito H. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. Oncol Rep [Internet]. 2011;25(4):1139–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249320
101. Ullen A, Schwarz S, Lennartsson L, Kalkner KM, Sandstrom P, Costa F, et al. Zoledronic acid induces caspase-dependent apoptosis in renal cancer cell lines. Scand J Urol Nephrol [Internet]. 2009;43(2):98–103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101859
102. Koizumi M, Nakaseko C, Ohwada C, Takeuchi M, Ozawa S, Shimizu N, et al. Zoledronate has an antitumor effect and induces actin rearrangement in dexamethasone-resistant myeloma cells. Eur J Haematol [Internet]. 2007;79(5):382–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903213
103. Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, et al. Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human

non-small-cell lung cancer cell line. Cell Prolif. 2011;44(2):139–46.

104. Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper M a. Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. J Carcinog. 2011;10:2.
105. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. J Intern Med. 2005;258(6):479–517.
106. He Y-C, Zhou F-L, Shen Y, Liao D-F, Cao D. Apoptotic Death of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. Int J Mol Sci [Internet]. 2014;15(5):8335–51. Available from: http://www.mdpi.com/1422-0067/15/5/8335/
107. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(3):231–41.
108. Cellsignal. Regulation of Apoptosis Overview [Internet]. Cell. 2014. p. 2014. Available from: https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-apoptosis-regulation
109. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19(3–4):325–31.
110. Kischkel FC, Lawrence D a, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity. 2000;12(6):611–20.
111. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. J Biol Chem. 2001;276(49):46639–46.
112. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: Decisions between life and death. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2007. p. 1462–75.
113. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. J Cell Sci. 2005;118:265–7.
114. Song X, Kim SY, Lee YJ. Evidence for Two Modes of Synergistic Induction of Apoptosis by Mapatumumab and Oxaliplatin in Combination with

Hyperthermia in Human Colon Cancer Cells. PLoS One. 2013;8(8).

115. Hockenbery DM. Targeting mitochondria for cancer therapy. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2010. p. 476–89.
116. Ma X, Zhou J, Zhang CX, Li XY, Li N, Ju RJ, et al. Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes. Biomaterials. 2013;34(18):4452–65.
117. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep [Internet]. 2006;7(10):988–94. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1618369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
118. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. Nature [Internet]. 2004;432(7015):307–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549092
119. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol [Internet]. 2007;35(4):495–516. Available from: http://tpx.sagepub.com/content/35/4/495.full
120. Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. Cancer Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;332(2):374–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.013
121. Dr T, Sussman RT, Ricci MS, Hart LS. Chemotherapy-Resistant Side-Population of Colon Cancer Cells ND ES SC RIB ND ES SC RIB. 2007;6(9):1490–5.
122. Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. Crit Rev Immunol. 2005;25(1):31–58.
123. Micheau O. Cellular FLICE-inhibitory Protein: An Update. In: Apoptosis and Cancer Therapy: From Cutting-edge Science to Novel Therapeutic Concepts. 2008. p. 120–56.
124. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in

glioblastoma. Mol Cancer. 2006;5:67.

125. Zobalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. Biochem Biophys Res Commun. 2008;373(4):567–71.
126. Zobalova R, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. Cancer cells with high expression of CD133 exert FLIP upregulation and resistance to TRAIL-induced apoptosis. In: BioFactors. 2009. p. 231–5.
127. Piggott L, Omidvar N, Marti Perez S, French R, Eberl M, Clarkson RW. Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent, TRAIL. Breast Cancer Res [Internet]. 2011;13(5):R88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914219
128. Ding L, Yuan C, Wei F, Wang G, Zhang J, Bellail AC, et al. Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP. Cancer Invest [Internet]. 2011;29(8):511–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21877938
129. Fukuda S, Foster RG, Porter SB, Pelus LM. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34+ cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. Blood. 2002;100(7):2463–71.
130. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. J Exp Med. 2007;204(7):1603–11.
131. Pennartz S, Belvindrah R, Tomiuk S, Zimmer C, Hofmann K, Conradt M, et al. Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: Comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. Mol Cell Neurosci. 2004;25(4):692–706.
132. Carter BZ, Qiu Y, Huang X, Diao L, Zhang N, Coombes KR, et al. Survivin

is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. Blood [Internet]. 2012;120(1):173–80. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3390955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

133. Jin F, Zhao L, Zhao HY, Guo SG, Feng J, Jiang XB, et al. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. Neuroscience. 2008;154(2):541–50.
134. Kelly PN, Puthalakath H, Adams JM, Strasser A. Endogenous bcl-2 is not required for the development of Emu-myc-induced B-cell lymphoma. Blood [Internet]. 2007;109(11):4907–13. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1885522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
135. Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. Cancer Immun. 2009;9(August 2008):1–7.
136. Tagscherer KE, Fassl a, Campos B, Farhadi M, Kraemer a, Böck BC, et al. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. Oncogene. 2008;27(52):6646–56.
137. Wu S, Wang X, Chen J, Chen Y. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;434(4):898–903. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.053
138. Wang L, Guo H, Yang L, Dong L, Lin C, Zhang J, et al. Morusin inhibits human cervical cancer stem cell growth and migration through attenuation of NF-κB activity and apoptosis induction. Mol Cell Biochem. 2013;379(1–2):7–18.
139. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. Nat Rev Drug Discov [Internet].

2008;7(12):979–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043449

140. Guzman ML. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. Blood. 2001;98(8):2301–7.
141. Warner JK, Wang JCY, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. Oncogene [Internet]. 2004;23(43):7164–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378077
142. Zhou J, Zhang H, Gu P, Bai J, Margolick JB, Zhang Y. NF-κB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. Breast Cancer Res Treat. 2008;111(3):419–27.
143. Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. Genome Biol. 2008;9(5):R83–2008–9–5–r83. Epub 2008 May 20.
144. Ju JH, Jang K, Lee KM, Kim M, Kim J, Yi JY, et al. CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-??B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. Carcinogenesis. 2011;32(10):1474–83.
145. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. Oncogene. 2006;25(46):6170–5.
146. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. Cancer Letters. 2009. p. 116–26.
147. Tu H-F, Lin S-C, Chang K-W. MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg [Internet]. 2013;21(2):104–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340306
148. Wong QWL, Lung RWM, Law PTY, Lai PBS, Chan KYY, To KF, et al. MicroRNA-223 Is Commonly Repressed in Hepatocellular Carcinoma and Potentiates Expression of Stathmin1. Gastroenterology. 2008;135(1):257–69.
149. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss

of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. Oncogene [Internet]. 2009;28(40):3526–36. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3492882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

150. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2010;107(1):264–9. Available from: http://www.pnas.org/content/107/1/264.full
151. Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A, et al. MiR-130b promotes CD133+ liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. Cell Stem Cell. 2010;7(6):694–707.
152. Wong QWL, Ching AKK, Chan AWH, Choy KW, To KF, Lai PBS, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. Clin Cancer Res. 2010;16(3):867–75.
153. Bao B, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Bao G, Ali S, et al. Targeting CSC-related miRNAs for cancer therapy by natural agents. Curr Drug Targets [Internet]. 2012;13(14):1858–68. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3792656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
154. Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Meng Y, Li L, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. PLoS One. 2009;4(8).
155. Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. Cell Cycle. 2010. p. 1031–6.
156. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. Cell Biochem Funct [Internet].

2012;30(5):411–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374783

157. EMD Millipore Corporation I. Muse ™ Count & Viability Kit User ' s Guide. 2013;MCH100102:1–101. Available from: www.millipore.com
158. EMD Millipore Corporation I. Muse ™ Annexin V & Dead Cell Kit. 2013;MCH100105. Available from: www.millipore.com
159. EMD Millipore Corporation I. Muse ™ Cell Cycle Kit User ' s Guide. 2013;100106. Available from: www.millipore.com
160. QIAGEN. RT Profiler PCR Array manual [Internet]. 2011. Available from: www.qiagen.com
161. Fu-Shi Han1, Mou-Bin Lin2, Hui-Yuan Zhu3, Ying-Qun Chen4, Wei Shui1 J-MX. Anti-proliferation effect of zoledronic acid on human colon cancer line SW480. Asian Pac J Trop Med [Internet]. 2015;8(11):881–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.10.015
162. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. Spandidos Publications; 2010;24(1):233–9.
163. Xie F, Li P, Gong J, Zhang J, Ma J. The bisphosphonate zoledronic acid effectively targets lung cancer cells by inhibition of protein prenylation. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2015 Nov 27;467(4):664–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15307890
164. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI, Rostami-H A, et al. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. Br J Cancer [Internet]. 2001 Apr 20 [cited 2015 Apr 25];84(8):1126–34. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2363858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
165. Biray Avci C, Kurt CC, Tepedelen BE, Ozalp O, Goker B, Mutlu Z, et al. Zoledronic acid induces apoptosis via stimulating the expressions of ERN1,

TLR2, and IRF5 genes in glioma cells. Tumor Biol [Internet]. Tumor Biology; 2016;37(5):6673–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4519-3

166. Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Tada Y, Sekine I, et al. Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. Cell Death Dis [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;5(11):e1517. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4260733&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
167. Varol U, Degirmenci M, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, et al. Zoledronic acid increases cytotoxicity by inducing apoptosis in hormone and docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. Tumour Biol [Internet]. 2015;36(2):779–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25293519
168. Frenzel A, Grespi F, Chmelewskij W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. Apoptosis. 2009;14(4):584–96.
169. Wang IT, Chou SC, Lin YC. Zoledronic acid induces apoptosis and autophagy in cervical cancer cells. Tumour Biol [Internet]. 2014;35(12):11913–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142231
170. Ottewell PD, Monkkonen H, Jones M, Lefley D V, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. J Natl Cancer Inst [Internet]. 2008;100(16):1167–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695136
171. Aoyagi T, Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Tajima T, Yoshiyama A, et al. Lung cancer cell line sensitivity to Zoledronic acid is BAX-dependent. Anticancer Res [Internet]. 2013;33(12):5357–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324070
172. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature [Internet]. Macmillan Magazines Ltd.; 2000 Oct 12;407(6805):770–6. Available from:

http://dx.doi.org/10.1038/35037710

173. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature [Internet]. 1999 Feb 4;397(6718):441–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/17135
174. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. Cell [Internet]. 1997;91(4):479–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557\nhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400804341
175. Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. Biochimie [Internet]. 2002 Feb;84(2–3):187–93. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908402013706
176. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM. Bid, but Not Bax, Regulates VDAC Channels. J Biol Chem. 2004;279(14):13575–83.
177. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie a E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene. 1998;17(25):3247–59.
178. Robak PS and T. Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs) as Potential Molecular Targets for Therapy of Hematological Malignancies [Internet]. Current Molecular Medicine. 2011. p. 633–49. Available from: http://www.eurekaselect.com/node/75348/article
179. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. J Bone Miner Res. 1998;13(4):581–9.
180. Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac,

Cdc42, and Rho GTPases. J Bone Miner Res. 2006;21(5):684–94.

181. Senaratne SG, Mansi JL, Colston KW. The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. Br J Cancer [Internet]. 2002 May 6 [cited 2015 Apr 25];86(9):1479–86. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
182. Shipman CM, Croucher PI, Russell RGG, Helfrich MH, Rogers MJ. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. Cancer Res. 1998;58(23):5294–7.
183. Rogers MJ. New Insights Into the Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. Curr Pharm Des [Internet]. 2003;9(32):2643–58. Available from: http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2003/00000009/00000032/art00002\nhttp://dx.doi.org/10.2174/1381612033453640
184. Segawa H, Kimura S, Kuroda J, Sato K, Nogawa M, Yuasa T, et al. The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529. Leuk Res. 2005;29(4):451–7.
185. Göbel A, Thiele S, Browne AJ, Rauner M, Zinna VM, Hofbauer LC, et al. Combined inhibition of the mevalonate pathway with statins and zoledronic acid potentiates their anti-tumor effects in human breast cancer cells. Cancer Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2016;375(1):162–71. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383516301409
186. Kubista B, Trieb K, Sevelda F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. J Orthop Res [Internet]. 2006;24(6):1145–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16602111
187. Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM. Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. Bone [Internet]. Elsevier; 2016 Nov 19;33(2):216–28. Available

from: http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00223-0

188. Forsea A-M, Müller C, Riebeling C, Orfanos CE, Geilen CC. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit cell cycle progression in human melanoma cells. Br J Cancer [Internet]. 2004 Aug 16 [cited 2015 Sep 3];91(4):803–10. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2364766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

189. Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Urasaki Y, et al. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate. Blood. 2003;102(6):2229–35.

Özgeçmiş

1978 yılında İran'ın Maragheh şehrinde doğmuştur. 2001 yılında Tebriz Üniversitesinin Doğa bilimleri Fakültesi'nde Biyoloji -hayvansal bilimleri- bölümünde lisans eğitimini tamamlamıştır. 2003 - 2009 yılları arasında lise biyoloji öğretmeni olarak çalıştı. 2009 yılında Urmiye Tıp Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamış ve 2012 yılında üniversitenin tüm yüksek lisans öğrencilerin arasında birinci olarak mezun oldu. 2013 yılında Türkiye'ye taşınıp Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Araştırma ilgisi kanser araştırmaları üzerinde olduğundan 2014 yılında Ege Üniversitesi Temel Onkoloji bölümünde Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi programında ikinci yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 yılında FEBS- Netherland tarafından bir aylık uluslararası araştırma felowşipi kazandı. Doktora eğitimine başladığından itibaren, 6 BAP projesi ve bir TÜBİTAK 1003 projesinde araştırmacı olarak görev almıştır. Evlidir ve bir yaşında bir erkek çocuğu bulunmaktadır.